

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-533410

(P2002-533410A)

(43) 公表日 平成14年10月8日 (2002. 10. 8)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] (参考)
A 6 1 K 45/00		A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 4
31/192		31/192	4 C 0 8 6
31/194		31/194	4 C 2 0 6
31/216		31/216	
31/4406		31/4406	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 57 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2000-590675(P2000-590675)
(86) (22) 出願日 平成11年12月17日 (1999. 12. 17)
(85) 翻訳文提出日 平成13年6月22日 (2001. 6. 22)
(86) 国際出願番号 P C T / U S 9 9 / 2 7 9 4 5
(87) 国際公開番号 W O 0 0 / 3 8 7 2 4
(87) 国際公開日 平成12年7月6日 (2000. 7. 6)
(31) 優先権主張番号 6 0 / 1 1 3 , 9 5 5
(32) 優先日 平成10年12月23日 (1998. 12. 23)
(33) 優先権主張国 米国 (U S)
(31) 優先権主張番号 6 0 / 1 4 2 , 6 1 6
(32) 優先日 平成11年7月7日 (1999. 7. 7)
(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 ジー. ディー. サール エルエルシー
アメリカ合衆国 イリノイ州 シカゴ ビー. オー. ボックス 5110 コーポレート
パテント デパートメント
(72) 発明者 シコルスキ ジェイムズ エイ.
アメリカ合衆国 ミズーリ州 デス ベレス
イースト ロイヤル コート 2313
(72) 発明者 グレン ケヴィン シー.
アメリカ合衆国 ミズーリ州 チェスター
フィールド プリンストン ゲート コート 509
(74) 代理人 弁理士 清水 初志 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 心臓血管に適用するためのコレステリルエステル転送タンパク質阻害剤およびフィブリン酸誘導体の組み合わせ

(57) 【要約】

本発明は、高コレステロール血症、アテローム性動脈硬化症、および高脂血症等の心血管疾患を予防ならびに治療するための、心血管治療用化合物の組み合わせを提供する。開示される組み合わせには、コレステリルエステル転送タンパク質 (CETP) 阻害剤と併用されるフィブリン酸誘導体が含まれる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 第1の量のフィブリン酸誘導体化合物と第2の量のコレステリルエステル転送タンパク質阻害化合物とを含み、該第1の量と第2の量が合わせて、化合物の抗高脂血症状態に有効な量、抗アテローム性動脈硬化症状態に有効な量、または抗高コレステロール血症状態に有効な量を含む治療用組み合わせ。

【請求項2】 フィブリン酸誘導体化合物がクロフィブラートを含む、請求項1記載の治療用組み合わせ。

【請求項3】 フィブリン酸誘導体化合物がフェノフィブラートを含む、請求項1記載の治療用組み合わせ。

【請求項4】 フィブリン酸誘導体化合物がシプロフィブラートを含む、請求項1記載の治療用組み合わせ。

【請求項5】 フィブリン酸誘導体化合物がベザフィブラートを含む、請求項1記載の治療用組み合わせ。

【請求項6】 フィブリン酸誘導体化合物がゲムフィブロジルを含む、請求項1記載の治療用組み合わせ。

【請求項7】 フィブリン酸誘導体化合物がクリノフィブラートを含む、請求項1記載の治療用組み合わせ。

【請求項8】 フィブリン酸誘導体化合物がビニフィブラートを含む、請求項1記載の治療用組み合わせ。

【請求項9】 組み合わせがフィブリン酸誘導体化合物およびコレステリルエステル転送タンパク質阻害化合物を含有する組成物を含む、請求項1記載の治療用組み合わせ。

【請求項10】 予防または治療が必要な患者に、第1の量のフィブリン酸誘導体化合物と第2の量のコレステリルエステル転送タンパク質阻害化合物とを含有する組み合わせを単位剤形で投与することを含む、高脂血症状態を予防または治療するための方法であって、該第1の量と第2の量が合わせて、化合物の抗高脂血症状態に有効な量を含む方法。

【請求項11】 予防または治療が必要な患者に、第1の量のフィブリン酸誘導体化合物と第2の量のコレステリルエステル転送タンパク質阻害化合物とを

含有する組み合わせを単位剤形で投与することを含む、アテローム性動脈硬化症状態を予防または治療するための方法であって、該第1の量と第2の量が合わせて、化合物の抗アテローム性動脈硬化症状態に有効な量を含む方法。

【請求項12】 予防または治療が必要な患者に、第1の量のフィブリン酸誘導体化合物と第2の量のコレステリルエステル転送タンパク質阻害化合物とを含有する組み合わせを単位剤形で投与することを含む、高コレステロール血症を予防または治療するための方法であって、該第1の量と第2の量が合わせて、化合物の抗高コレステロール血症状態に有効な量を含む方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

本出願は、1999年7月7日に出願された米国仮特許出願第60/142,616号、および1998年12月23日に提出された米国仮特許出願第60/113,955号の優先権を主張するものである。

【0002】**発明の背景**

本発明は、心血管疾患を治療する方法、具体的には、医学、特に、哺乳動物におけるアテローム性動脈硬化症、高コレステロール血症、およびその他の冠状動脈疾患などに関連する、高脂血症状態の予防および治療において、化合物、組成物、およびそれらの使用法を組み合わせることに関する。より具体的には、本発明は、コレステリルエステル転送タンパク質 (CETP) 活性阻害化合物に関する。本発明は、フィブリン酸誘導体化合物 (フィブラート) にも関する。

【0003】**関連技術の説明**

総コレステロール濃度および低比重リポタンパク質 (LDL) コレステロール濃度の上昇に伴う高脂血症状態が、冠状動脈性心疾患、特に、アテローム性動脈硬化症の主要な危険因子であるということは定説となっている。多くの研究によって、高比重リポタンパク質 (high density lipoprotein) (HDL) コレステロールの血漿内濃度が低いことは、アテローム性動脈硬化症の発生において強力な危険因子であることが明らかになった (BarterおよびRye, *Atherosclerosis*, 121, 1-12 (1996))。HDLは、血液内での脂質輸送に作用するリポタンパク質の主要なクラスの一つである。HDLと会合することが知られている主要な脂質には、コレステロール、コレステリルエステル、トリグリセリド、リン脂質、および脂肪酸が含まれる。血液中に存在するその他のリポタンパク質のクラスは、低比重リポタンパク質 (LDL)、中間比重リポタンパク質 (IDL)、および超低比重リポタンパク質 (VLDL) である。HDLコレステロールが低レベルになると、アテローム性動脈硬化症の危険性が増大するため、血漿HDLコレステロールを増加させる方法は、アテローム性動脈硬化症、および血管内の脂質蓄積に関連したその他の疾

病を治療する上で有益であると考えられる。このような疾患には、冠状動脈性心疾患、末梢血管疾患、脳卒中が含まれるが、これらに限定されることはない。

【0004】

アテローム性動脈硬化症によって、現代社会における罹病および死亡の主要な原因である多くの冠状動脈性疾患 (CAD) が引き起こされている。高LDLコレステロール (約180 mg/dlを上回る) および低HDLコレステロール (35 mg/dlを下回る) が、アテローム性動脈硬化症発生の重要な原因であることが示されている。その他の疾患または危険因子、例えば、末梢血管疾患、脳卒中、および高コレステロール血症などは、有害なHDL/LDS比によってマイナスの影響を受ける。

【0005】

腸管の管腔からの胆汁酸の再循環を妨害することと、血清コレステロール値の低下との間には因果関係があることが見出されている。この低下がアテローム性動脈硬化症の病状の改善をもたらすことを示す、疫学的データが蓄積されている。ステドロンスキー (Stedronsky) は、「胆汁酸およびコレステロールと、低コレステロール血症性非全身性物質との相互作用 (Interaction of bile acids and cholesterol with nonsystemic agents having hypocholesterolemic properties)」、*Biochimica et Biophysica Acta*, 1210, 255-287 (1994)において、胆汁酸およびコレステロールの周囲の生化学、生理学、および既知の活性化物質について考察している。

【0006】

コレステリルエステル転送タンパク質 (CETP) の阻害が、血漿HDL/LDL比を効果的に変化させることが示されているため、特定の心血管疾患の進行および/または形成を抑制することが期待されている。CETPは、血液中にある様々なリポタンパク質の間をコレステリルエステルおよびトリグリセリドが移動するのを促進する血漿タンパク質である (Tall, J. Lipid Res., 34, 1255-74 (1993))。CETPによってコレステリルエステルがHDLからLDLに移動すると、HDLコレステロールが低下するという作用が生じる。したがって、CETPを阻害すると、血漿HDLコレステロールの上昇と、血漿LDLコレステロールの低下がもたらされることになり、それによって、治療上有益な血漿脂質プロファイルが提供される。このような

作用における証拠が、マッカーシー (McCarthy) 、*Medicinal Res. Revs.*, 13, 139-59 (1993) に記載されている。本作用の更なる証拠が、シトリ (Sitori) 、*Pharmac. Ther.*, 67, 443-47 (1995) に記載されている。この現象は、最初、スウェンソン (Swenson) ら (*J. Biol. Chem.*, 264, 14318 (1989)) が、CETPを特異的に阻害するモノクローナル抗体を用いることで証明された。ウサギでは、この抗体によって、血漿HDLコレステロールの上昇と、LDLコレステロールの減少が引き起こされた。サン (Son) ら (*Biochim. Biophys. Acta*, 795, 743-480 (1984)) は、ヒト血漿由来のタンパク質であって、CETPを阻害するタンパク質について記載している。クシュワハ (Kushwaha) らに付与され、参照として本明細書に組み入れられる米国特許第5,519,001号は、ヒトapo C-1由来であって、CETP活性を阻害する36アミノ酸のペプチドについて記載している。チョー (Cho) ら (*Biochim. Biophys. Acta*, 1391, 133-144 (1998)) は、ブタ血漿由来であって、ヒトCETPを阻害するペプチドについて記載している。ポーニン (Bonin) ら (*J. Peptide Res.*, 51, 216-225 (1998)) は、CETPにおけるデカペプチド阻害剤について記載している。ヘッジ (Hedge) らは、*Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 8, 1277-80 (1998) において、CETP阻害剤としてデプシペプチド (depspeptide) 真菌代謝物を開示している。

【0007】

CETP阻害剤として作用する非ペプチド化合物が、いくつか報告されている。バレット (Barrett) ら (*J. Am. Chem. Soc.*, 118, 7863-63 (1996)) は、シクロプロパンを含むCETP阻害剤について記載している。さらに、クオ (Kuo) ら (*J. Am. Chem. Soc.*, 117, 10629-34 (1995)) も、シクロプロパンを含むCETP阻害剤を記載している。ピエトゾンカ (Pietzonka) ら (*Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 6, 1951-54 (1996)) は、CETP阻害剤として、コレステリルエステルのホスホン酸塩含有類似体について記載している。コーバル (Coval) ら (*Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 5, 605-610 (1995)) は、CETP阻害剤として、ヴィーデンジオール (Wiedendiol) -Aおよび-B、ならびに関連セスキテルペン化合物を開示している。リー (Lee) ら (*J. Antibiotics*, 49, 693-96 (1996)) は、昆虫真菌 (insect fungus) 由来のCETP阻害剤について記載している。ブッシュ (Busch) ら (*Lipids*,

25, 216-220, (1990)) は、CETP阻害剤として、コレステリルアセチルプロマイドを記載している。モートン (Morton) およびジルバーシュミット (Zilversmit) (J. Lipid Res., 35, 836-47 (1982)) は、p-クロロメルクリフェニルスルホン酸塩、p-ヒドロキシメルクリ安息香酸塩、およびエチルメルクリチオサリチル酸塩が、CETPを阻害すると述べている。コノリー (Connolly) ら (Biochem, Biophys. Res. Comm., 223, 42-47 (1996)) は、CETP阻害剤として、別のシステイン修飾試薬を開示している。シア (Xia) らは、CETP阻害剤として1,3,5-トリアジンを記載している (Bioorg. Med. Chem. Lett., 6, 919-22 (1996))。ビスゲイアー (Bisgaier) ら (Lipids, 29, 811-8 (1994)) は、CETP阻害剤として、4-フェニル-5-トリデシル-4H-1,2,4-トリアゾール-チオールを開示している。参照として本明細書に組み入れられる米国特許出願第09/153,360号には、別のトリアゾールCETP阻害剤が記載されている。シロルスキ (Sirorski) らは、さらに、国際公開公報第9914204号において新規のCETP阻害剤を開示している。

【0008】

置換された2-メルカプトアニリンアミド化合物をCETP阻害剤として使用することができ、且つこのような治療用化合物が、国際公開公報第98/35937号において、シンカイ (Shinkai) らにより記載されている。

【0009】

置換されたヘテロアルキルアミン化合物には、CETP阻害剤として知られているものがある。欧州特許出願第796846号において、シュミット (Schmidt) らは、2-アリール置換ピリジンを、心血管物質として有用なコレステロールエステル転送タンパク質阻害剤として記載している。ピリジン環のC₆位の置換基が、ヒドロキシアルキル基であってもよい。欧州特許出願第801060号において、ドウ (Dow) およびライト (Wright) は、1-ヒドロキシ-1アミンを提供するためにアルキルアミンをアルデヒド付加産物で置換したヘテロ環状誘導体について記載している。これらは、糖尿病およびその他の障害を治療するのに有用な β^3 アドレナリン受容体アゴニストであると報告されている。英国特許出願第2305665号において、フィッシャー (Fisher) らは、コレステロール量やアテローム性動脈硬化症などの障害を治療するのに有用である3-アゴニスト第二級アミノアルコールで置換

されたピリジン誘導体を開示している。欧州特許出願第818448号（参照として本明細書に組み入れられる）において、シュミット (Schmidt) らは、コレステロールエステル転送タンパク質阻害剤としてテトラヒドロキノリン誘導体を開示している。欧州特許出願第818197号において、シュメック (Schmek) らは、コレステロールエステル転送タンパク質阻害剤として融合されたヘテロ環を有するピリジンを記載している。ブランデス (Brandes) らは、独国特許出願第19627430号において、コレステロールエステル転送タンパク質阻害剤として二環式縮合ピリジン誘導体について記載している。国際公開公報第9839299号において、ミュラーグリーマン (Müller-Gliemann) らは、コレステロールエステル転送タンパク質阻害剤としてキノリン誘導体について記載している。

【0010】

また、CETP阻害剤として有用な多環式化合物も、日本特許第10287662号において、オオムラ (Oomura) らによって開示されている。例えば、C-1およびC-8という構造をもつ治療用化合物をペニシリウム属の種 (*Penicillium spp.*) を培養することによって調製した。

【0011】

CETP阻害剤として有用なシクロアルキルピリジンが、シュミット (Schmidt) らによって、欧州特許第818448号において開示されている。例えば、C-9構造をもつ治療用化合物が、CETP阻害剤として特に効果的な化合物として開示されている。

【0012】

CETP阻害剤として有用である、置換されたテトラヒドロナフタレン化合物が、国際公開公報第9914174号に記載されている。その開示において、有用なCETP阻害剤として具体的に記載されているのは、(8S)-3-シクロペンチル-1-(4-フルオロフェニル)-2-[(S)-フルオロ(4-トリフルオロメチルフェニル)メチル]-8-ヒドロキシ-6-スピロシクロ (spiroclobutyl) -5,6,7,8-テトラヒドロナフタレンである。

【0013】

国際公開公報第9914215号には、CETP阻害剤として有用な4-ヘテロアリール-テ

トラヒドロキノリンがいくつか記載されている。例えば、その開示において、有用なCETP阻害剤として、3-(4-トリフルオロメチルベンゾイル)-5,6,7,8-テトラヒドロキノリン-5-オンについて記載している。

【0014】

フィブリン酸誘導体はリポタンパク質濃度に対する影響を有する別のクラスの薬剤を含む。開発されたこれらの薬剤の最初のクラスは、参照として本明細書に組み入れられている米国特許第3,262,850号に開示されているクロフィブラートであった。クロフィブラートはp-クロロフェノキシソブチル酸のエチルエステルである。このクラスにおいて広範に使用されている薬剤は、参照として本明細書に組み入れられている米国特許第3,674,836号に開示されているゲムフィブロジル(gemfibrozil)である。ゲムフィブロジル(gemfibrozil)はトリグリセリド濃度を低下するまたはHDLコレステロール濃度を増加するために使用されることが多い(The Pharmacological Basis of Therapeutics, p 893、参照として本明細書に組み入れられる)。フェノフィブラート(米国特許第4,058,552号、参照として本明細書に組み入れられる)はゲムフィブロジル(gemfibrozil)と同様の作用を有するが、さらにLDL濃度を低下する。シプロフィブラート(米国特許第3,948,973号、参照として本明細書に組み入れられる)はフェノフィブラートと同様の作用を有する。このクラスの別の薬剤はベザフィブラートである(米国特許第3,781,328号、参照として本明細書に組み入れられる)。フィブリン酸誘導体を使用することによる副作用の警告には胆嚢疾患(胆石症)、横紋筋融解症および急性腎不全が挙げられる。これらの作用のいくつかは、フィブラートをHMG CoAレダクターゼ阻害剤と併用すると悪化する。

【0015】

心血管疾患を治療するための併用療法が、いくつか文献に記載されている。心血管疾患の治療に有用な、IBAT阻害剤とHMG CoAレダクターゼ阻害剤との組み合わせが、参照として本明細書に組み入れられる米国特許出願第09/037,308号において開示されている。

【0016】

フルバスタチン(fluvastatin)とニセリトロールの併用療法が、J.ササキ(S

asaki) ら (前記) によって開示されている。この研究者らは、フルバスタチンとニセリトロールの組み合わせを「750 mg/日で投薬すると、フルバスタチンの有利な効果を増強も減衰もさせないようである」と結論づけている。

【0017】

L.カシン-ヘムフィル (Cashin-Hemphill) ら (J. Am. Med. Assoc., 264(23), 3013-17 (1990)、参照として本明細書に組み入れられる) は、冠状動脈のアテローム性動脈硬化症に対する、コレステロールとナイアシンの併用療法の有利な効果について記載している。そこに記載されている効果には、生来の冠状動脈損傷の非進行および退行が含まれる。

【0018】

アシピモクス (acipimox) とシンバスタチン (simvastatin) の併用療法は、トリグリセリドレベルが高い患者において有利なHDL効果を示す (N. Hoogerbruggeら, J. Internal Med., 241, 151-55 (1997)、参照として本明細書に組み入れられる)。

【0019】

シトスタノールエステルマーガリンとプラバスタチンの併用療法について、H. ギリング (Gylling) らが説明している (J. Lipid Res., 37, 1776-85 (1996))。この療法は、インシュリン非依存性糖尿病患者の男性において、有意にコレステロールの吸収を阻害すると同時に、LDLコレステロールを低下させると報告されている。

【0020】

ブラウン (Brown) ら (New Eng. J. Med., 323 (19), 1289-1339 (1990)、参照として本明細書に組み入れられる) は、ロバスタチンだけの場合に較べて、アテローム性動脈硬化症障害の進行を低下させ、損傷部の退行を促進させる、ロバスタチンとコレステロールの併用療法について説明している。

【0021】

チャン (Chang) らは、参照として本明細書に組み入れられる国際公開公報第9823593号において、apoB分泌阻害剤とCETP阻害剤との併用療法を開示した。

【0022】

ブーフ (Buch) ら (国際公開公報第9911263号、参照として本明細書に組み入れられる) は、狭心症、アテローム性動脈硬化症、複合性高血圧症、および高脂血症を罹患した被験者を治療し、且つ心停止症状を治療するための、アムロジピンとスタチン化合物を含む併用療法について説明している。ブーフ (Buch) らは、国際公開公報第9911259号において、アムロジピンとアトルバスタチン (atorvastatin) を含む併用療法について説明している。

【0023】

スコット (Scott) ら (国際公開公報第9911260号) は、アトルバスタチンと降圧剤との併用療法について説明している。

【0024】

デットマー (Dettmar) およびギブソン (Gibson) (英国特許出願第GB 232933 4 A号) は、血漿中の低比重リポタンパク質およびコレステロールの量を低下させるのに有用な治療用組成物における、HMG CoAレダクターゼ阻害剤と胆汁組み合わせ物質 (bile complexing agent) を含む組成物について主張している。

【0025】

上述した参考文献は、心血管疾患を予防および治療するための安全で有効な薬剤を見出す必要が依然として存在していることを示している。

【0026】

発明の概要

心血管疾患を予防および治療するための安全で有効な薬剤を見出すことに対する必要が依然として存在していることに対処するための、心血管用薬剤の併用療法をここで報告する。

【0027】

いくつかの態様において、本発明は、第1の量のCETP阻害化合物、および第2の量の別の心血管治療物質を使用することを含む、高脂血症、アテローム性動脈硬化症、または高コレステロール血症の予防および治療に有用な併用療法であって、該第1の量と第2の量が合わせて、化合物の抗高脂血症状態に有効な量、抗アテローム性動脈硬化症状態に有効な量、または抗高コレステロール血症状態に有効な量を物を含む併用療法を提供する。例えば、本発明における多くの態様の一つ

は、治療用量のCETP阻害化合物およびフィブリン酸誘導体化合物を含む併用療法である。

【0028】

本発明のさらなる態様において、高コレステロール血症、アテローム性動脈硬化症、または高脂血症を予防および治療するための、本明細書に開示された任意の心血管併用療法を使用することを含む。したがって、一つの態様において、本発明は、高脂血症状態の予防または治療を必要とする患者に、第1の量のフィブリン酸誘導体化合物と第2の量のCETP阻害化合物とを含み、該第1の量と第2の量が合わせて、化合物の抗高脂血症状態に有効な量となる組み合わせを単位剤形にして投与する段階を含む、高脂血症状態を予防または治療するための方法を提供する。

【0029】

別の態様において、本発明は、アテローム性動脈硬化症状態の予防または治療を必要とする患者に、第1の量のフィブリン酸誘導体化合物と第2の量のCETP阻害化合物とを含み、該第1の量と第2の量が合わせて、化合物の抗アテローム性動脈硬化症状態に有効な量となる組み合わせを単位剤形にして投与する段階を含む、アテローム性動脈硬化症状態を予防または治療するための方法を提供する。

【0030】

さらに別の態様において、本発明は、高コレステロール血症状態の予防または治療を必要とする患者に、第1の量のフィブリン酸誘導体化合物と第2の量のCETP阻害化合物とを含み、該第1の量と第2の量とが合わせて、化合物の抗高コレステロール血症状態に有効な量となる組み合わせを単位剤形にして投与する段階を含む、高コレステロール血症状態を予防または治療するための方法を提供する。

【0031】

本発明の利用可能なさらなる範囲は、以下に述べる詳細な説明から明らかになると思われる。しかしながら、以下の詳細な説明および実施例は、発明の好ましい態様を示すものではあるが、当業者には、発明の精神と範囲内において、以下の説明からさまざまに変更や修正を行いうることが明らかであるため、例示のためのものにすぎないと解されるべきである。

【0032】

好ましい態様における詳細な説明

以下の詳細な説明は、本発明を実施する上で当業者の参考となるよう提供されるものである。当業者は、本発明における発見の精神および範囲から逸脱することなく、本明細書で検討している態様の修正および変更を行うことができるため、以下の詳細な説明が本発明を不当に制限するものであるとして解釈してはならない。

【0033】

本明細書が引用する各参考文献の内容は、これらの一次参考文献の中で引用されている引用文献の内容も含め、その全体が参照として本明細書に組み入れられる。

【0034】

a. 定義

以下の定義は、本発明の詳細な説明の読み手が、その内容を理解する助けとなるよう提供されたものである。

【0035】

「併用療法」とは、例えば、アテローム性動脈硬化症および高コレステロール血症など高脂血症状態を治療するために2種類またはそれ以上の治療物質を投与することを意味する。このような投与には、有効成分を一定の割合で一つのカプセルに入れたり、または各阻害剤を複数の別個のカプセルに入れたりして、これらの治療物質を実質的に同時になるような様式で、同時投与することを含む。さらに、このような投与は、それぞれの治療物質を連続した様式で用いることも含む。どちらの場合も、治療レジメによって、高脂血症状態を治療する上で薬剤を併用することの有利な効果が提供される。

【0036】

「治療上有効な」という語句は、併用療法における阻害剤の併用量が適切であるということが意図される。この併用量によって、高脂血症状態を低下または消失させるという目標が達成されることが考えられる。

【0037】

「治療用化合物」とは、アテローム性動脈硬化症および高コレステロール血症を含む高脂血症状態を予防または治療する上で有用な化合物を意味する。

【0038】

b. 組み合わせ

本発明の組み合わせには多くの使用方法があると考えられる。例えば、用量の調整および医学的モニタリングによって、本発明の組み合わせに用いる治療用化合物の各用量を、治療用化合物を単剤療法で使用する場合の一般的な用量よりも減少させることができると考えられる。用量の減少によって、単剤療法に較べて、各治療用化合物の副作用が減少するなどの利点がもたらされられると思われる。さらに、単剤療法に較べて、併用療法には副作用が少ないため、より多くの患者に治療レジメを適用することができる。

【0039】

本発明の別の用途は、相補的な作用または相補的な作用様式を有する組み合わせにおいてである。例えば、IBAT阻害剤は、回腸における胆汁酸の再吸収を阻害することによって血清コレステロール濃度を調節する。一方、CETP阻害剤は、血中の種々のリポタンパク質間のコレステリルエステルおよびトリグリセリドの移動を阻害する。

【0040】

本発明において有用な化合物には、多様な治療用化合物が含まれる。本発明において有用な各CETP阻害剤化合物のいくつかは、次の各特許出願に別途記載されており、それぞれ参照として本明細書に組み入れられる。

【0041】

- R9. 米国特許出願第60/101661号
- R10. 米国特許出願第60/101711号
- R11. 米国特許出願第60/101660号
- R12. 米国特許出願第60/101664号
- R13. 米国特許出願第60/101668号
- R14. 米国特許出願第60/101662号
- R15. 米国特許出願第60/101663号

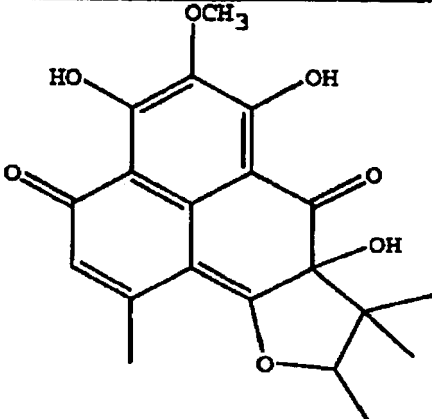
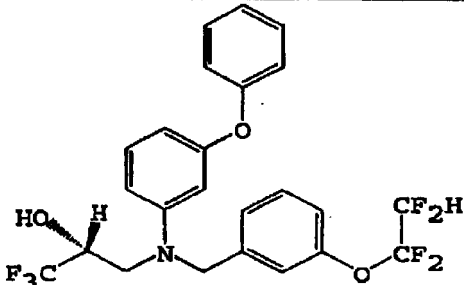
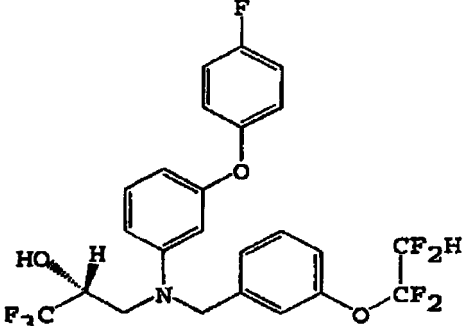
- R16. 米国特許出願第60/101669号
- R17. 米国特許出願第60/101667号
- R18. 米国特許出願第09/401,916号
- R19. 米国特許出願第09/405,524号
- R20. 米国特許出願第09/404,638号
- R21. 米国特許出願第09/404,638号
- R22. 米国特許出願第09/400,915号
- R23. 米国特許第5,932,587号
- R24. 米国特許第5,925,645号

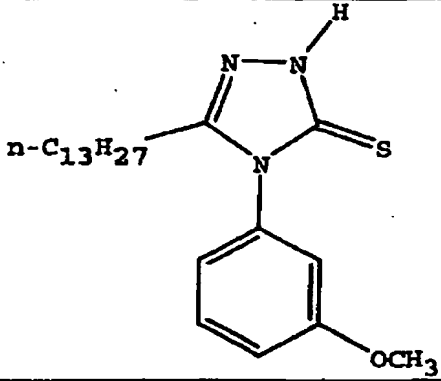
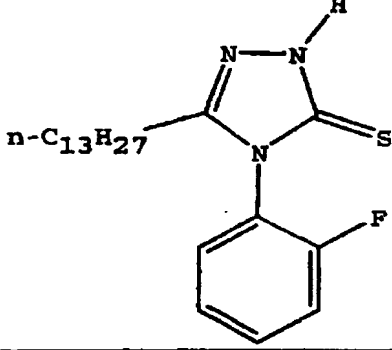
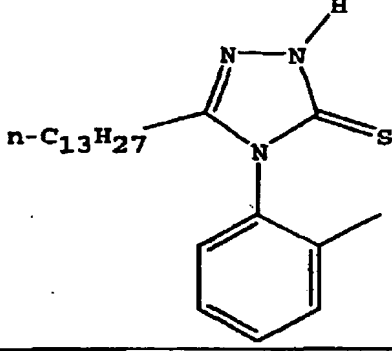
【0042】

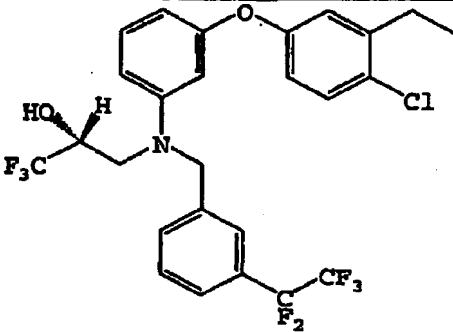
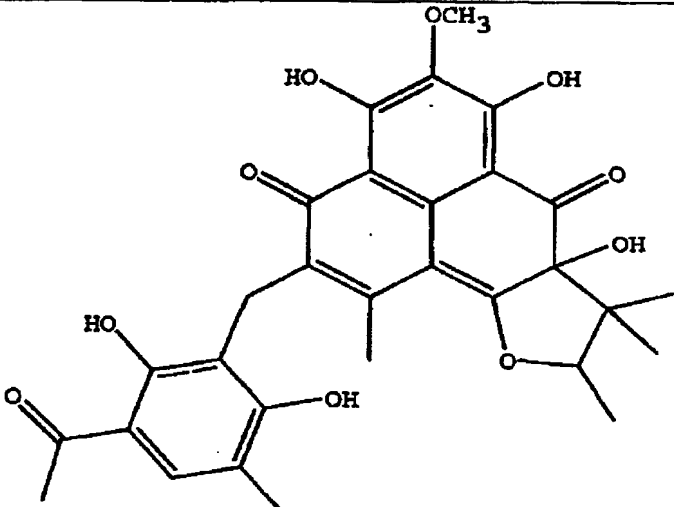
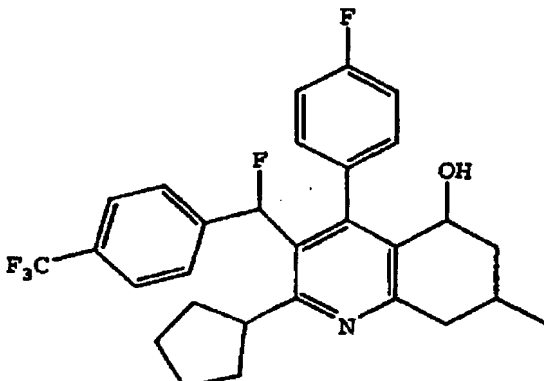
本発明において特に関心対象となるCETP阻害剤化合物には、表1に示す化合物、ならびに表1のCETP阻害剤のジアステレオマー、鏡像異性体、ラセミ体、塩、および互変異性体などが含まれる。

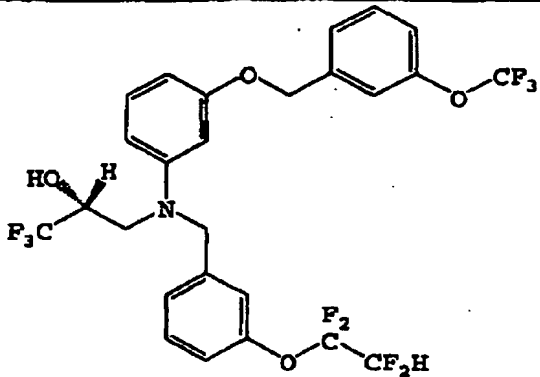
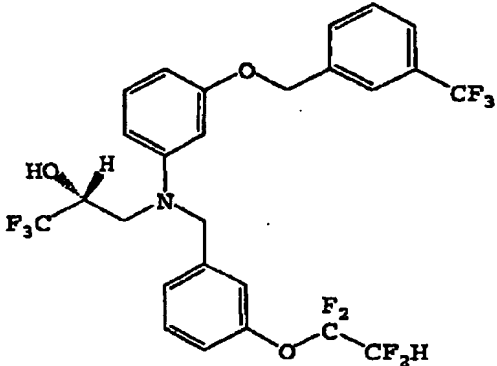
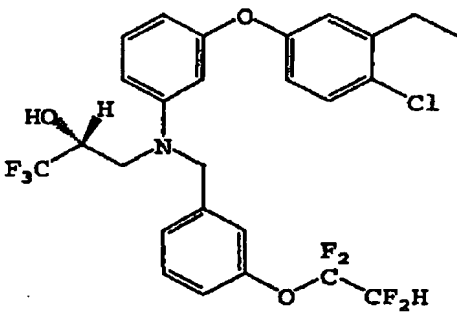
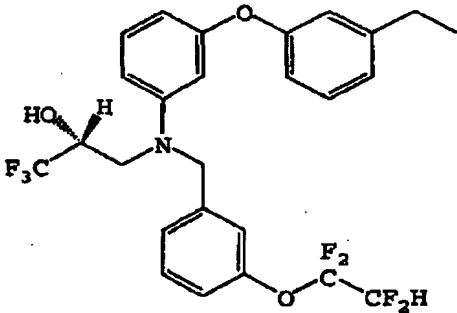
【0043】

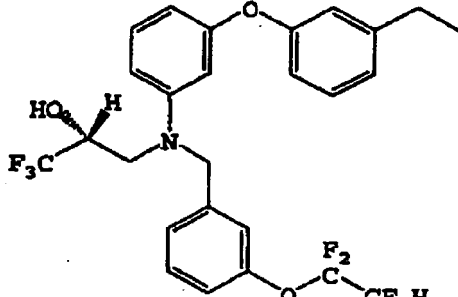
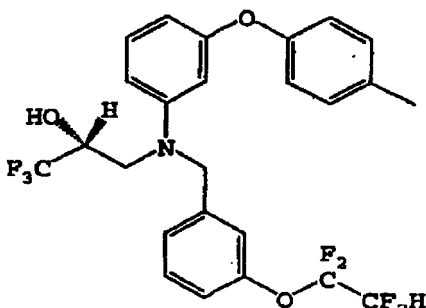
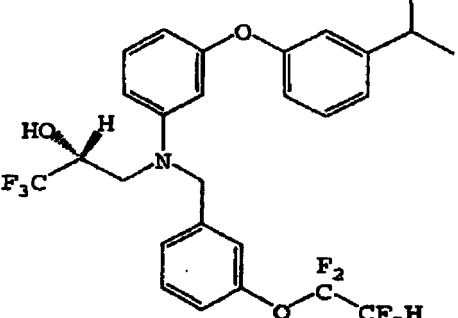
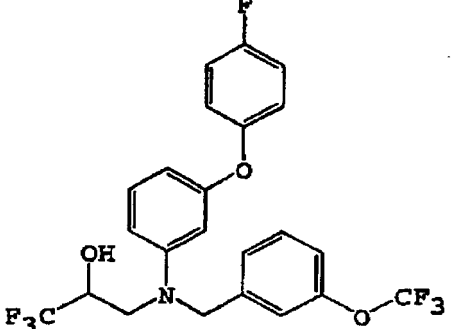
【表1】

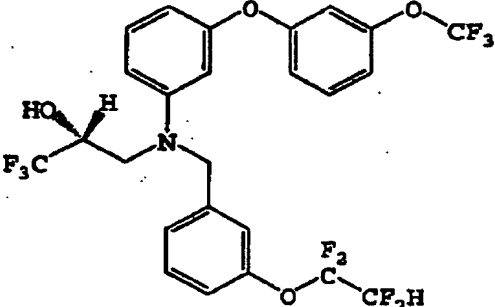
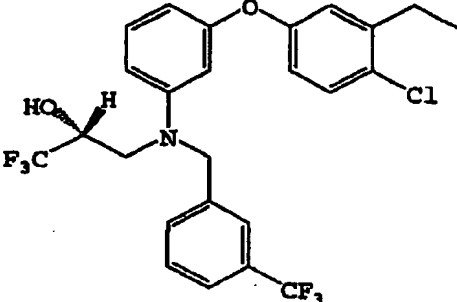
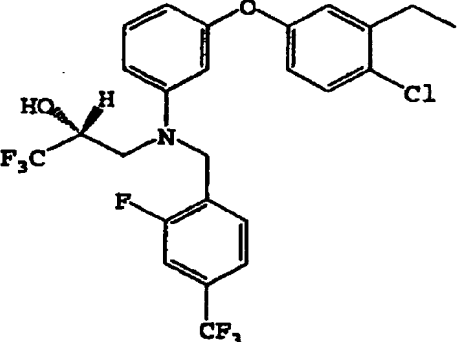
化合物番号	構造
C-1	
C-2	
C-3	

C-4	 <chem>CCCCCCCCCCCCCc1nc([NH])c(=S)n1-c2cccc(OC)c2</chem>
C-5	 <chem>CCCCCCCCCCCCCc1nc([NH])c(=S)n1-c2ccccc2F</chem>
C-6	 <chem>CCCCCCCCCCCCCc1nc([NH])c(=S)n1-c2ccccc2C</chem>
C-7	

	
C-8	
C-9	

C-10	 <p>Chemical structure of compound C-10: A central nitrogen atom is bonded to a 1-hydroxy-1-(trifluoromethyl)ethyl group (with H on a wedge and HO on a dash), a 4-(2-(2-(trifluoromethoxy)ethoxy)phenyl)methyl group, and a 4-(2-(2-(trifluoromethoxy)ethoxy)phenyl)methyl group. The two phenyl rings are connected via an ether linkage at their para positions.</p>
C-11	 <p>Chemical structure of compound C-11: A central nitrogen atom is bonded to a 1-hydroxy-1-(trifluoromethyl)ethyl group (with H on a wedge and HO on a dash), a 4-(2-(2-(trifluoromethoxy)ethoxy)phenyl)methyl group, and a 4-(2-(2-(trifluoromethoxy)ethoxy)phenyl)methyl group. The two phenyl rings are connected via an ether linkage at their para positions.</p>
C-12	 <p>Chemical structure of compound C-12: A central nitrogen atom is bonded to a 1-hydroxy-1-(trifluoromethyl)ethyl group (with H on a wedge and HO on a dash), a 4-(2-(2-(trifluoromethoxy)ethoxy)phenyl)methyl group, and a 4-(2-(2-(trifluoromethoxy)ethoxy)phenyl)methyl group. The two phenyl rings are connected via an ether linkage at their para positions.</p>
C-13	 <p>Chemical structure of compound C-13: A central nitrogen atom is bonded to a 1-hydroxy-1-(trifluoromethyl)ethyl group (with H on a wedge and HO on a dash), a 4-(2-(2-(trifluoromethoxy)ethoxy)phenyl)methyl group, and a 4-(2-(2-(trifluoromethoxy)ethoxy)phenyl)methyl group. The two phenyl rings are connected via an ether linkage at their para positions.</p>

C-14	 <chem>CCOc1ccc(Oc2ccc(N(Cc3ccc(OCF2)cc3)C(C)(O)C(F)(F)F)cc2)cc1</chem>
C-15	 <chem>COc1ccc(Oc2ccc(N(Cc3ccc(OCF2)cc3)C(C)(O)C(F)(F)F)cc2)cc1</chem>
C-16	 <chem>CC(C)Oc1ccc(Oc2ccc(N(Cc3ccc(OCF2)cc3)C(C)(O)C(F)(F)F)cc2)cc1</chem>
C-17	 <chem>COc1ccc(N(Cc2ccc(OC(F)(F)F)cc2)C(C)(O)C(F)(F)F)cc1Oc3ccc(F)cc3</chem>

C-18	
C-19	
C-20	

【0044】

本発明の組み合わせおよび方法において有用なフィブリン酸誘導体は、多様な構造および機能性を含んでいる。本発明において好ましいフィブリン酸誘導体を表2に記載する。表2の治療用化合物は、酸や塩という形状、ラセミ体、鏡像異性体、双性イオン、および互変異性体を含むさまざまな形態で、本発明において使用することができる。表2で参照している米国特許はすべて、参照として本明細書に組み入れられる。

【0045】

【表2】

化合物番号	一般名	CAS登録番号	特許文書 参考文献
G-41	クロフィブラート	637-07-0	U.S. 3,262,850
G-70	フェノフィブラート	49562-28-9	U.S. 4,058,552
G-38	シプロフィブラート	52214-84-3	U.S. 3,948,973
G-20	ベザフィブラート	41859-67-0	U.S. 3,781,328
G-78	ゲムフィプロジル	25182-30-1	U.S. 3,674,836
G-40	クリノフィブラート	69047-39-8	U.S. 3,716,583
G-24	ビニフィブラート	30299-08-2	BE 884722

【0046】

本発明において有用な化合物（例えば、フィブリン酸誘導体化合物、またはCE TP阻害化合物）は、不斉炭素分子を持たなくてもよく、あるいは、有用な化合物は1つまたは複数の不斉炭素分子をもつことができる。有用な化合物が1つまたは複数の不斉炭素分子をもつ場合には、当然ながら、それらは、ジアステレオマーや鏡像異性体などのラセミ体および立体異性体を純粋な形状および混合物の形状で含む。このような立体異性体は、鏡像異性体の出発材料を反応させるか、または、本発明の化合物の異性体を分離するかのいずれかにより、従来の技術を用いて調製することができる。

【0047】

異性体には、例えば、二重結合を挟んだシス異性体またはトランス異性体などの幾何異性体が含まれる。このような異性体はすべて、本発明において有用な化合物に含まれる。

【0048】

本発明において有用な化合物には、互変異性体も含まれる。

【0049】

以下で考察されているような、本発明において有用な化合物には、塩、溶媒化合物、およびプロドラッグが含まれる。

【0050】

用量、製剤化、および投与経路

本発明に係る組成物は、これらの化合物を、それらが体内で作用する部位、例えば、ヒトなどの哺乳動物の回腸の中、血漿、または肝臓などと接触させる何らかの方法によって、好ましくは経口で、高脂血疾患または症状を予防および治療

するために投与することができる。

【0051】

上記症状を予防または治療するために、本発明に係る組成物および方法において有用な化合物を、化合物それ自体として使用することができる。薬学的に許容される塩は、これらの親化合物に較べて水溶性が高いため、医学的に応用するのに特に適している。このような塩は、明確に、薬学的に許容される陰イオンまたは陽イオンを持っていなければならない。本発明の化合物における薬学的に許容される適当な酸付加塩は、可能な場合には、塩酸、臭化水素酸、リン酸、無水リン酸、硝酸、スルホン酸、硫酸などの無機酸；酢酸、ベンゼンスルホン酸、安息香酸、クエン酸、エタンスルホン酸、フマル酸、グルコン酸、グリコール酸、イソチオン酸、乳酸、ラクトバイオニック (lactobionic)、マレイン酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、コハク酸、トルエンスルホン酸、酒石酸、およびトリフルオロ酢酸などの有機酸に由来するものである。医療目的には、塩化物塩が特に好ましい。薬学的に許容される適当な塩基性塩には、アンモニウム塩；ナトリウム塩およびカリウム塩などのアルカリ金属塩類；ならびにマグネシウム塩およびカルシウム塩などのアルカリ土類塩などがある。

【0052】

本発明において有用な陰イオンは、当然ながら薬学的に許容されることが必要とされることから、上記のリストの中から選択される。

【0053】

本発明において有用な化合物は、許容される担体とともに、薬学的組成物の形態で提供されうる。担体は、当然ながら組成物の他の成分に適合するものという意味で許容されるものでなければならないし、且つ受容者に有害なものであってはならない。担体は、固体もしくは液体であっても、またはその両方であってもよく、化合物とともに、該有効化合物を重量にして0.05%から95%含むことのできる、例えば錠剤などの単位投薬組成物として製剤化することが好ましい。本発明に係る別の化合物を含む、その他の薬学的有効物質を含ませることもできる。本発明の薬学的組成物は、本質的には、成分を混合することからなる公知の製薬技術のいずれかを用いて調製することができる。

【0054】

選択的には、本発明の組み合わせは、フィブリン酸誘導体化合物およびCETP阻害化合物を含む組成物を含むことができる。このような組成物では、フィブリン酸誘導体化合物およびCETP阻害化合物を、例えば、両化合物を含む丸剤、カプセル剤、または液剤などの単一剤形を含む形態で提供することができる。

【0055】

別個の治療用化合物、または治療用化合物の組み合わせのいずれかとして、薬剤とともに用いることができる通常の任意の手段によって、これらの化合物を投与することができる。

【0056】

所望の生物学的作用を達成するために必要とされる化合物量は、当然ながら、選択された具体的な化合物、意図される用途、投薬方法、および受容者の臨床症状などの多くの要素に依存する。

【0057】

一般的には、フィブリン酸誘導体の一日当たり服用総量は、一回で投与する場合、または数回に分けて投与する場合に、約1000 mg/日から約3000 mg/日の範囲でありうる。ゲムフィブロジルまたはクリノフィブラートはしばしば、例えば1200 mg/日用量でそれぞれ別個に投与される。クロフィブラートはしばしば、2000 mg/日用量で投与される。ビニフィブラートはしばしば、1800 mg/日用量で投与される。

【0058】

CETP阻害剤については、一日の投薬総量は、体重1 kg当たり約0.01 mg/日から約100 mg/日、好ましくは、体重1 kg当たり約0.5 mg/日から約20 mg/日の間であることが、一般的に適当であると思われる。

【0059】

さまざまな治療用化合物について上記段落で説明した一日当たり用量は、単一用量として患者に投与することもでき、複数回の用量に配分して投与することもできる。配分用量 (subdose) は、一日当たり2回から6回に分けて投与することができる。投薬用量は、所望の結果を得るのに有効な徐放性形態にすることができる。

きる。

【0060】

薬学的に許容される塩の場合には、上記の重量は、該塩に由来する治療用化合物の酸等価物または塩基等価物の重量を意味する。

【0061】

本発明の組み合わせの経口送達には、当技術分野において公知のように、いくつかのメカニズムにより、薬剤を胃腸管への延長的送達または持続的送達を行うための製剤が含まれる。これらには、小腸のpH変化に基づき、pH感受性の放出を剤形から行わせること、錠剤またはカプセルをゆっくりと溶かすこと、製剤の物理的な性質によって胃の中で持続させること、腸管の粘膜内側に剤形を生物学的に接着させること、または、剤形から有効薬剤を酵素的に放出させることが含まれるが、これらに限定されることはない。本発明において有用な治療用化合物（例えば、フィブリン酸誘導体またはCETP阻害剤）の中には、意図した作用が、剤形を操作することによって有効な薬剤分子が作用部位に送達されるまでの時間を延長することのあるものもある。このように、腸溶性、および腸溶性制御放出性の製剤は、本発明の範囲内に含まれる。適した腸溶コーティングには、酢酸セルロースフタル酸、ポリビニル酢酸フタル酸、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタル酸、ならびに、メタクリル酸およびメタクリル酸メチルエステルの陰イオンポリマーが含まれる。

【0062】

本発明の組み合わせは、固体、半固体、または液体の形態のいずれかであって、経口的に送達することができる。本発明の組み合わせを液状または半固形状にする場合には、例えば、液剤、シロップ剤、またはゲル状カプセル（例えば、ゲルキャップ）に入れた形状にすることができる。一つの態様において、CETP阻害剤を本発明の組み合わせで用いる場合には、液剤、シロップ剤、またはゲル状カプセルに入れた形状でCETP阻害剤を提供することができる。別の態様において、フィブリン酸誘導体を本発明に係る組み合わせで用いる場合には、液剤、シロップ剤、またはゲル状カプセルに入れた形でフィブリン酸誘導体を提供することができる。

【0063】

CETP阻害剤については、静脈内投与する用量は、例えば、約0.003 mg/体重 (kg) から約1.0 mg/体重 (kg)、好ましくは、約0.01 mg/体重 (kg) から約0.75 mg/体重 (kg)、より好ましくは、約0.1 mg/体重 (kg) から約0.6 mg/体重 (kg) の範囲となりうる。

【0064】

静脈内投与する場合に、フィブリン酸誘導体の用量は、例えば、約100 mg/体重 (kg) から約2000 mg/体重 (kg)、好ましくは、約300 mg/体重 (kg) から約1000 mg/体重 (kg)、より好ましくは、約400 mg/体重 (kg) から約750 mg/体重 (kg) の範囲となりうる。

【0065】

これらの治療用化合物いずれの用量も、1分間あたり約10 ng/体重 (kg) から約100 ng/体重 (kg) の輸液として適宜投与することができる。この目的に適した輸液には、例えば、1ミリリットル当たり約0.1 ngから約10 mg、好ましくは、約1 ngから約10 mgが含まれうる。単位用量には、例えば約1 mgから約10 gの本発明の化合物が含まれうる。すなわち、注射用のアンプルには、例えば、約1 mgから約100 mgが含まれうる。

【0066】

本発明に係る薬学的組成物には、経口投与、直腸投与、局所投与、頬投与（例えば、舌下投与）、および非経口投与（例えば、皮下、筋肉内、皮内、または静脈内への投与）に適した薬学的組成物が含まれるが、所与の場合にもっとも適した経路は、治療すべき症状の性質と重度に依存し、且つ使用すべき特定の化合物の性質にも依存する。ほとんどの場合、好適な投与経路は経口投与である。

【0067】

経口投与に適した薬学的組成物は、予め決められた量の本発明において有用な治療用化合物を少なくとも一つ含むカプセル剤、カシエ剤、トローチ剤、または錠剤など；粉剤または顆粒剤など；水性または非水性液中の溶液もしくは懸濁液など；または水中油型もしくは油中水型乳化剤などを、個別単位で提供することができる。本明細書で示しているように、このような組成物は、有効化合物と担

体（1種類またはそれ以上の補助成分を構成することができる）を会合させる段階を含む適当な製薬法によって調製することができる。一般的に、組成物は、有効化合物を、液体担体または細かく分割した固形担体、もしくはその両方と共に均一かつ完全に混合してから、必要な場合には、製品を成形して調製することができる。例えば、錠剤は、化合物の粉末または顆粒を、選択的には、1種類またはそれ以上の補助成分と共に圧縮または鋳型に流して調製することができる。圧縮錠剤は、場合によっては、結合剤、潤滑剤、不活性希釈剤、および/または表面活性/分散剤と混合した粉末または顆粒など、自由に流動する形状の化合物を適当な機械で圧縮して調製することができる。鋳型で成形した錠剤は、不活性液体希釈剤で湿らせた粉末化合物を適当な機械で成型して製造することができる。

【0068】

頬に（舌下）投与するのに適した薬学的組成物には、通常、ショ糖およびアラビアゴムまたはトラガカントガムなどの香味基剤の中に本発明の化合物を含むトローチ剤、および、ゼラチンおよびグリセリン、またはショ糖およびアラビアゴムなどの不活性基剤の中に該化合物を含むトローチ剤などがある。

【0069】

非経口投与するのに適した薬学的組成物は、本発明の化合物の滅菌水性調製剤などを適宜含む。これらの製剤は、好ましくは静脈内投与されるが、皮下、筋肉内、または皮内への注射という手段によって投与することも可能である。このような製剤は、化合物を水と混合し、得られた溶液を滅菌し、血液と等張にして適宜調製することができる。本発明に係る注射用組成物は、一般的に、本明細書において開示されている化合物を0.1から5% (w/w) 含むと考えられる。

【0070】

直腸投与するのに適した薬学的組成物は、好ましくは、単位用量の坐薬として提供される。これらは、本発明の化合物を1種類またはそれ以上の通常の固形担体、例えば、ココアバターなどと混合した後、得られた混合物を成型することにより調製することができる。

【0071】

局所投与するのに適した薬学的組成物は、好ましくは、軟膏、クリーム、ロー

ション、ペースト、ゲル、スプレー、エアロゾル、または油脂の形態をしている。使用することのできる担体には、石油ゼリー（例えば、ワセリン）、ラノリン、ポリエチレングリコール、アルコール類、およびこれらを2種類またはそれ以上組み合わせたものなどがある。有効化合物は、一般的に組成物を0.1%から5% (w/w)、例えば、0.5から2%の濃度で含んでいる。

【0072】

経皮投与も可能である。経皮投与するのに適した薬学的組成物は、長時間にわたって受容者の表皮と密接に接触したままであるように調整された一枚毎のパッチとして提供されうる。このようなパッチは、本発明の化合物を、接着剤に溶解および/もしくは分散させた、またはポリマーの中に分散させた、選択的には緩衝された水溶液の中に適宜含んでいる。有効化合物の濃度として適しているのは、約1%から35%、好ましくは、約3%から15%である。一つの具体的な可能性としては、例えば、Pharmaceutical Research, 3(6), 318 (1986)に記載されているように、電気輸送またはイオン泳動によって、パッチから化合物を送達することができる。

【0073】

いずれの場合にも、単一剤形を製造するために担体物質と組み合わせることができる有効成分の量は、治療を受ける本人、および特定の投与方法によって変化する。

【0074】

上記のカプセル剤、錠剤、丸剤、粉剤、ゲルキャップ、および顆粒剤を含む、経口投与するための固体剤形は、シヨ糖、乳糖、またはデンプンなどの少なくとも1つの不活性希釈剤と混合された、本発明において有用な化合物を1種類またはそれ以上含む。また、このような剤形は、通常の実施におけるように、不活性希釈剤以外の添加物質、例えば、ステアリン酸マグネシウムなどの潤滑剤、または、シクロデキストリンなどの溶解剤も含む。カプセル剤、錠剤、粉剤、顆粒剤、ゲルキャップ、および丸剤の場合には、剤形が緩衝剤を含んでいてもよい。さらに、錠剤および丸剤は、腸溶コーティングとともに調製することができる。

【0075】

経口投与するための液状剤形には、薬学的に許容される乳剤、溶液、懸濁液、シロップ、および当技術分野において通常使用される不活性希釈剤である水などを含むエリキシル剤などがありうる。また、このような組成物は、湿潤剤、乳化剤および懸濁剤、ならびに、甘味料、風味料、および香料などのアジュバントも含みうる。

【0076】

注射用調製物、例えば、滅菌した注射用の水性または油性の懸濁液を、適当な分散剤または硬化剤および分散剤を用いて、既知の方法に従って製剤化することができる。また、滅菌注射用調製物は、例えば、1,3-ブタンジオール中の溶液のように、非毒性の非経口で許容される希釈剤または溶剤中の滅菌注射液または懸濁液であってもよい。許容される賦形剤および溶剤で使用できるものには、水、リンゲル溶液、および等張塩化ナトリウム溶液などがある。さらに、滅菌した固定油が、溶媒または懸濁培地として通常使用される。この目的には、合成モノグリセリドまたはジグリセリドを含む、無菌性の固定油を用いることができる。さらに、オレイン酸などの脂肪酸は、注射液の調製に用いることができる。

【0077】

薬学的に許容される担体には、前記の担体などが含まれる。

【0078】

併用療法において、本発明において有用な治療物質の2種類以上の投与は、別個の処方剤を連続的に投与するか、または単一製剤もしくは別個の製剤を同時に投与して行うことができる。投与は、経口経路によって、または、静脈内注射、筋肉内注射、もしくは皮下注射によって行うことができる。製剤は、ボーラスの形状、または水性もしくは非水性の等張滅菌注射溶液もしくは懸濁液の形状にすることができる。これらの溶液および懸濁液は、1種類またはそれ以上の薬学的に許容される担体もしくは希釈剤、またはゼラチンもしくはヒドロキシプロピルメチルセルロースなどの結合剤を、1種類またはそれ以上の潤滑剤、保存剤、表面活性剤、または分散剤と共に含む滅菌粉剤もしくは顆粒剤から調製することができる。

【0079】

経口投与するには、薬学的組成物を、例えば、錠剤、カプセル剤、懸濁液、または液剤の形状にすることができる。カプセル剤や錠剤などは、当技術分野において公知の常法によって調製することができる。薬学的組成物は、好ましくは、特定の1種類またはそれ以上の有効成分を含む用量単位の形状にする。用量単位の例としては、錠剤またはカプセル剤である。これらは、1種類またはそれ以上の治療用化合物を上記の量で含みうるという利点をもつ。例えば、CETP阻害剤の場合、用量範囲は、約0.01 mgから約500 mg、またはこれ以外の任意の用量であってもよいが、当技術分野において知られているように、具体的な阻害剤によって異なる。フィブリン酸誘導体の場合には、用量範囲は、約0.01 mgから約500 mg、またはそれ以外の任意の用量であってもよいが、当技術分野において知られているように具体的な阻害剤によって異なる。

【0080】

有効成分は、例えば、食塩水、デキストロース、または水を適当な担体として用いることのできる組成物として、注射によって投与することもできる。それぞれの有効な治療用化合物について一日当たりの適当な用量は、上述した経口投与によって生じるのと同じ血液血清レベルを生じさせる用量である。

【0081】

治療用化合物は、さらに、経口/経口、経口/非経口、または非経口/非経口の経路を組み合わせ投与してもよい。

【0082】

本発明の治療法において使用する薬学的組成物は、経口で投与するか、または静脈内投与することができる。経口投与による併用療法が好適である。経口投与のための投薬は、一日一回の投薬を必要とするレジメ、または、一日おきに一回投薬する必要があるレジメ、または一日中間隔をおいて複数回投与する必要があるレジメによって行うことができる。併用療法を成り立たせる治療用化合物は、組み合わせられた剤形で、または実質的に同時に経口投与するための分離した剤形のいずれかで、同時に投与することができる。また、併用療法を成り立たせる治療用化合物は、二段階の摂取を必要とするレジメによって、投与すべき治療用化合物をそれぞれ連続して投与することもできる。すなわち、あるレジメにおいて

は、別々の有効薬剤を、間隔を開けて摂取して、治療用化合物を連続的に投与する必要がある。複数の摂取段階間の時間的な間隔は数分から数時間であるが、治療用化合物の有効性、可溶性、生物学的利用能、血漿半減期、および動力学的プロフィールといった各治療用化合物の性質、ならびに食物摂取の効果、および患者の年齢および状態によって異なる。標的分子濃度の概日変化によっても、最適な投薬間隔が決定される可能性がある。併用療法における治療用化合物で、同時に投与されるか、実質的に同時に投与されるか、または連続的に投与されるものは、一方の治療用化合物を経口経路によって投与し、他方の治療用化合物を静脈内経路によって投与する必要のあるレジメを含んでいてもよい。治療用化合物が、経口経路によって、もしくは静脈内経路によって投与されようと、または別々に投与されるか、もしくは同時投与されようと、治療用化合物はそれぞれ、薬学的に許容される賦形剤、希釈剤、またはその他の製剤組成物からなる適当な薬剤に含まれていると思われる。薬学的に許容される適当な、経口投与用の治療用化合物を含む製剤は上記している。

【0083】

治療レジメ

例えば、アテローム性動脈硬化症など、疾患の要素として高脂血症を示す症状を予防、緩和、または改善するための投薬レジメ、または本発明の化合物および/もしくは組成物によって高コレステロール血漿もしくは血液に対する防御または更なる治療を行うための投薬療法を、さまざまな要素にしたがって選択する。それらの要素には、患者のタイプ、年齢、体重、性別、食事、および臨床症状、疾患の重症度、投与経路、使用される特定の化合物の活性、効能、薬物動力学、および毒物学的プロフィールなどの薬学的な判断要素、薬物送達システムを利用するか否か、ならびに化合物が薬物組み合わせの一部として投与されるか否かが含まれる。

【0084】

高脂血症を罹患した患者の治療を、まず、先に示した用量で開始することができる。一般的に、治療は、必要に応じ、高脂血症状態が抑制されるか消失するまで数週間から数ヶ月、または数年の期間にわたって続けられるべきである。本明

細書で開示された化合物または組成物による治療を受けている患者を、例えば、当技術分野において公知のいずれかの方法により血清中のLDL量および総コレステロール量を測定することによって、日常的にモニタリングして、併用療法の有効性を判定する。このようなデータを継続的に解析することによって、治療中に治療レジメを修正することが可能になり、その結果、いずれの時点でも、各タイプの治療用化合物をそれぞれ最も有効な量で投与することができるようになり、また、治療期間を決定することも可能になる。このようにして、全治療コースにわたって、治療レジメ/投薬スケジュールを合理的に修正することができるようになり、その結果、満足のゆく効果を合わせて示す最も低量の治療用化合物が投与され、且つ高脂血症状態の治療に成功するのに必要な期間だけ投与を続けることができるようになる。

【0085】

本明細書に開示された併用療法の利点として考えられるのは、アテローム性動脈硬化症や高コレステロール血症などの高脂血症状態を治療するのに有効な任意の各種治療用化合物、またはすべての治療用化合物の量を減少させることができることである。

【0086】

本発明のいくつかの態様の一つは、第1の量のCETP阻害剤、および第2の量の別の心血管治療物質を使用することを含む、高脂血症またはアテローム性動脈硬化症の予防および治療に有用な併用療法であって、該第1の量と第2の量が合わせて、化合物の抗高脂血症状態に有効な量または抗アテローム性動脈硬化症状態に有効な量を含む併用療法を含む。例えば、本発明における多くの態様の一つは、治療用量のフィブリン酸誘導体およびCETP阻害剤を含む併用療法である。

【0087】

本発明の態様は、本明細書に記載されているか、または組み入れられた2種類もしくはそれ以上の治療用化合物を用いる併用療法を含みうる。この併用療法は、化学的に異なって分類される2種類またはそれ以上の治療用化合物を含むことができ、例えば、フィブリン酸誘導体をCETP阻害剤と治療上併用することができる。治療用組み合わせで、2種類より多くの治療用化合物を含むことができる。

例えば、この治療は、フィブリン酸誘導体、CETP阻害剤、およびHMG CoAレダクターゼ阻害剤の使用を含むことができる。または、化学分類が同一の2種類またはそれ以上の治療用化合物は、例えば、2種類もしくはそれ以上のフィブリン酸誘導体、または2種類もしくはそれ以上のCETP阻害剤を含む併用療法などの治療を含むことができる。

【0088】

本発明のさらなる態様においては、本明細書に記載された、高コレステロール血症、アテローム性動脈硬化症、もしくは高脂血症を予防または治療するための任意の心血管併用療法を使用することが含まれる。

【0089】

以下の実施例は、制限的なものではなく、本発明のさまざまな局面を例示するために提供されるものである。

【0090】

C. 実施例

表3は、本発明の組み合わせの例をいくつか例示したものであり、この組み合わせは、第1の量のCETP阻害剤、および第2の量のフィブリン酸誘導体を含み、該第1の量と第2の量が合わせて、化合物の抗高脂血症状態に有効な量、または抗アテローム性動脈硬化症状態に有効な量を含んでいる。

【0091】

【表3】

例番号	成分1	成分2
1	C-1	クロフィブラート
2	C-2	クロフィブラート
3	C-3	クロフィブラート
4	C-4	クロフィブラート
5	C-5	クロフィブラート
6	C-6	クロフィブラート
7	C-7	クロフィブラート
8	C-8	クロフィブラート
9	C-9	クロフィブラート
10	C-10	クロフィブラート
11	C-11	クロフィブラート
12	C-12	クロフィブラート
13	C-13	クロフィブラート
14	C-14	クロフィブラート
15	C-15	クロフィブラート
16	C-16	クロフィブラート
17	C-17	クロフィブラート
18	C-18	クロフィブラート
19	C-19	クロフィブラート

20	C-20	クロフィブラート
21	C-1	フェノフィブラート
22	C-2	フェノフィブラート
23	C-3	フェノフィブラート
24	C-4	フェノフィブラート
25	C-5	フェノフィブラート
26	C-6	フェノフィブラート
27	C-7	フェノフィブラート
28	C-8	フェノフィブラート
29	C-9	フェノフィブラート
30	C-10	フェノフィブラート
31	C-11	フェノフィブラート
32	C-12	フェノフィブラート
33	C-13	フェノフィブラート
34	C-14	フェノフィブラート
35	C-15	フェノフィブラート
36	C-16	フェノフィブラート
37	C-17	フェノフィブラート
38	C-18	フェノフィブラート
39	C-19	フェノフィブラート
40	C-20	フェノフィブラート
41	C-1	シプロフィブラート
42	C-2	シプロフィブラート
43	C-3	シプロフィブラート
44	C-4	シプロフィブラート
45	C-5	シプロフィブラート
46	C-6	シプロフィブラート
47	C-7	シプロフィブラート
48	C-8	シプロフィブラート
49	C-9	シプロフィブラート
50	C-10	シプロフィブラート
51	C-11	シプロフィブラート
52	C-12	シプロフィブラート
53	C-13	シプロフィブラート
54	C-14	シプロフィブラート
55	C-15	シプロフィブラート
56	C-16	シプロフィブラート
57	C-17	シプロフィブラート
58	C-18	シプロフィブラート
59	C-19	シプロフィブラート
60	C-20	シプロフィブラート
61	C-1	ベザフィブラート
62	C-2	ベザフィブラート
63	C-3	ベザフィブラート
64	C-4	ベザフィブラート
65	C-5	ベザフィブラート
66	C-6	ベザフィブラート

67	C-7	ベザフィブラート
68	C-8	ベザフィブラート
69	C-9	ベザフィブラート
70	C-10	ベザフィブラート
71	C-11	ベザフィブラート
72	C-12	ベザフィブラート
73	C-13	ベザフィブラート
74	C-14	ベザフィブラート
75	C-15	ベザフィブラート
76	C-16	ベザフィブラート
77	C-17	ベザフィブラート
78	C-18	ベザフィブラート
79	C-19	ベザフィブラート
80	C-20	ベザフィブラート
81	C-1	ゲムフィブロジル
82	C-2	ゲムフィブロジル
83	C-3	ゲムフィブロジル
84	C-4	ゲムフィブロジル
85	C-5	ゲムフィブロジル
86	C-6	ゲムフィブロジル
87	C-7	ゲムフィブロジル
88	C-8	ゲムフィブロジル
89	C-9	ゲムフィブロジル
90	C-10	ゲムフィブロジル
91	C-11	ゲムフィブロジル
92	C-12	ゲムフィブロジル
93	C-13	ゲムフィブロジル
94	C-14	ゲムフィブロジル
95	C-15	ゲムフィブロジル
96	C-16	ゲムフィブロジル
97	C-17	ゲムフィブロジル
98	C-18	ゲムフィブロジル
99	C-19	ゲムフィブロジル
100	C-20	ゲムフィブロジル
101	C-1	クリノフィブラート
102	C-2	クリノフィブラート
103	C-3	クリノフィブラート
104	C-4	クリノフィブラート
105	C-5	クリノフィブラート
106	C-6	クリノフィブラート
107	C-7	クリノフィブラート
108	C-8	クリノフィブラート
109	C-9	クリノフィブラート
110	C-10	クリノフィブラート
111	C-11	クリノフィブラート
112	C-12	クリノフィブラート
113	C-13	クリノフィブラート

114	C-14	クリノフィブラート
115	C-15	クリノフィブラート
116	C-16	クリノフィブラート
117	C-17	クリノフィブラート
118	C-18	クリノフィブラート
119	C-19	クリノフィブラート
120	C-20	クリノフィブラート
121	C-1	ビニフィブラート
122	C-2	ビニフィブラート
123	C-3	ビニフィブラート
124	C-4	ビニフィブラート
125	C-5	ビニフィブラート
126	C-6	ビニフィブラート
127	C-7	ビニフィブラート
128	C-8	ビニフィブラート
129	C-9	ビニフィブラート
130	C-10	ビニフィブラート
131	C-11	ビニフィブラート
132	C-12	ビニフィブラート
133	C-13	ビニフィブラート
134	C-14	ビニフィブラート
135	C-15	ビニフィブラート
136	C-16	ビニフィブラート
137	C-17	ビニフィブラート
138	C-18	ビニフィブラート
139	C-19	ビニフィブラート
140	C-20	ビニフィブラート

【0092】

生物学的アッセイ法

本発明の組み合わせの有用性を以下のアッセイ法によって示す。これらのアッセイ法は、本質的には、本発明の有用性を明らかにすると認められる方法を用いて、インビトロ、および動物モデルで行なわれる。

【0093】

H14細胞において、IBATを介した $[^{14}\text{C}]$ -タウロコール酸 (TC) の取り込みを阻害する化合物のインビトロアッセイ法

生まれて間もないハムスターの腎細胞(BHK)をヒトIBATのcDNAで形質転換したもの(H14細胞)を、96ウェルのトップカウント (Top-Count) 組織培養プレートに、播種後24時間以内にアッセイを行うため、60,000細胞/ウェルを播種し、48時間以内にアッセイを行うためには30,000細胞/ウェルを播種し、および72時間以内にアッセイを行うためには10,000細胞/ウェルを播種する。

【0094】

アッセイを行う日に、100 μ lのアッセイ緩衝液（4.5 g/Lグルコース+0.2% (w/v)脂肪酸を含有しないウシ血清アルブミン-(FAF)BSAを含むダルベッコ修正イーグル培地）で一度細胞の単層を丁寧に洗浄する。各ウェルに、アッセイ緩衝液中2倍濃度の被験化合物50 μ lを、アッセイ緩衝液中6 μ Mの [4 C]-タウロコール酸50 μ lに加える（最終濃度3 μ Mの [4 C]-タウロコール酸）。細胞培養プレートを37℃で2時間インキュベートしてから、各ウェルを0.2% (w/v) (FAF)BSAを含む4℃ダルベッコのリン酸緩衝食塩水（PBS）100 μ lで2回ずつ穏やかに洗浄する。（FAF)BSAを含まない4℃の100 μ lのPBSにて1回、穏やかに洗浄する。それぞれに、200 μ lの液体シンチレーション測定溶液を加え、プレートをヒートシールしてから、室温で30分間振盪した後、パッカード（Pachard）トップカウント装置上で、各ウェルの放射エネルギーを測定する。

【0095】

[4 C]-アラニンの取り込みを阻害する化合物のインビトロアッセイ法

標識タウロコール酸の代わりに標識アラニンを用いる以外はタウロコール酸アッセイ法と同じ方法で、アラニン取り込みアッセイ法を行う。

【0096】

ラット回腸による [4 C]-タウロコール酸の胆汁への取り込みを阻害する化合物のインビボアッセイ法

（参照として本明細書に組み入れられる、ユネ（Une）らによる、*Biochimica et Biophysica Acta*, 833, 196-202 (1985)の「ハムスターにおける3 α ,7 β -ジヒドロキシ-7 α -メチル-5 β -コラン酸の代謝、および3 α ,7 β -ジヒドロキシ-7 α -メチル-5 β -コラン酸」を参照のこと。）

【0097】

雄のウィスター（Wister）ラット（200～300 g）を各100 mg/kgのインアクチン（inactin）で麻酔する。胆管に10"の長さのPE10チューブをカニユーレ挿入する。小腸を裸出して、ガーゼパッドの上に置く。カニユーレ（1/8"のルアーロック、先細の雌アダプター）を、小腸と盲腸の結合部から12 cmの所に挿入する。これと同じ結合部から4 cmの所に切り込みを入れる（回腸8 cmを利用する）

。20 mlの温かいダルベッコのリン酸緩衝食塩水、pH 6.5 (PBS) を用いて、小腸部分を洗い流す。遠位の開口部に長さ20 cmのシリコン製チューブ (0.02" I.D. x 0.037" O.D.) をカニユーレ挿入する。近位のカニユーレは、蠕動ポンプに取り付けて、腸を温PBSで20分間、0.25 ml/分にて洗浄する。腸セグメントの温度を連続的にモニタリングする。実験を開始するにあたって、2.0 mlの対照試料 (0.05 mCi/mLの $[^4\text{C}]$ -タウロコール酸に、5 mMの非放射性標識タウロコール酸) を、3 ml用注射器で腸セグメント中に入れ、胆汁試料の採集を開始する。対照試料を、0.25 ml/分の速度で21分間注入する。実験開始から27分経過するまで、胆汁試料画分を3分毎に採取する。21分間試料注入をした後、回腸のループを (30 ml用注射器を用いて) 20 mlの温かなPBSで洗い流してから、ループを温PBSによって、0.25 ml/分にて21分間洗浄する。2回目の灌流を上記のように開始するが、これは、投与された被験化合物でも行なって (21分間投与した後、21分間洗浄)、胆汁を最初の27分間、3分毎に採取する。必要な場合には、一般的に対照試料を含む3回目の灌流を上記のようにして行う。

【0098】

肝臓コレステロール濃度 (HEPATIC CHOL) の測定

肝臓組織の重さを計測した後、クロロホルム：メタノール (2:1) の中でホモジナイズする。破碎して遠心分離した後、上清を分離して、窒素存在下で乾燥させる。残渣をイソプロパノールに溶解させてから、アレイン (Allain)、C. A. ら、Clin. Chem., 20, 470 (1974) (参照として本明細書に組み入れられる) に記載されているように、コレステロールオキシダーゼとペルオキシダーゼを用いて、コレステロール含量を酵素的に測定する。

【0099】

肝臓HMG CoAレダクターゼ活性 (HMG CoA) の測定

肝臓試料をリン酸/ショ糖緩衝液の中でホモジナイズした後に遠心分離によって分離して、肝臓のミクロソームを調製する。最終的な沈殿物を緩衝液に再懸濁し、アリコート[®]を ^{14}C -HMG-CoA (デュポン-NEN社製) 存在下、37℃で60分間インキュベートして、HMG CoAレダクターゼ活性を測定する。6 N HCLを加えて反応を停止させた後、遠心分離する。上清のアリコートを薄層クロマトグラフィーによ

って分離し、酵素産物に対応したスポットをプレートから掻き取って抽出し、シンチレーションカウントによって放射能を測定する。(参考文献: Akerlund, J. および Bjorkhem, I. (1990) J. Lipid Res. 31, 2159)

【0100】

血清コレステロール (SER.CHOL, HDL-CHOL, TGI および VLDL + LDL) の測定

和光純薬 (Wako Fine Chemicals) (バージニア州リッチモンド) 由来の市販キット; コレステロール C11、カタログ番号: 276-64909 を用いて、総血清コレステロール (SER.CHOL) を酵素的に測定する。同じキットを用いて、HDLコレステロール (HDL-CHOL) を、シグマケミカル社 (Sigma Chemical Co.) の HDLコレステロール試薬、カタログ番号: 352-3 によって (デキストラン硫酸法で) VLDL および LDL を沈殿させた後に測定する。血清中の総トリグリセリド量 (ブランク) (TGI) を、シグマケミカル社の GPO-トリンダー (GPO-Trinder)、カタログ番号: 337-B によって酵素的に測定する。VLDL および LDL (VLDL + LDL) コレステロール濃度は、総コレステロール量と HDLコレステロール量との間の差として計算する。

【0101】

肝臓コレステロール 7- α -ヒドロキシラーゼ活性の測定 (7- α -OHase)

肝臓試料をリン酸/ショ糖緩衝液中で破碎した後に、遠心分離によって分離して、肝臓のミクロソームを調製する。最終的な沈殿物を緩衝液に再懸濁し、アリコートをし、NADPH 存在下、37℃ で 5 分間インキュベートして、コレステロール 7- α -ヒドロキシラーゼ活性を測定する。石油エーテル中で抽出した後、有機溶媒を蒸発させ、残渣をアセトニトリル/メタノールに溶解させる。抽出液のアリコートを C18 逆相 HPLC カラム上に注入し、240 nm での UV 検出を用いて、溶出物の定量を行うことによって、酵素産物を分離する。(参考文献: Horton, J.D. ら、(1994) J. Clin. Invest. 93, 2084)

【0102】

糞便中の胆汁酸濃度 (FBA) の測定

個体ごとに収容したハムスターから排泄された糞便を 24 時間または 48 時間の間、全部集め、窒素気流下で乾燥させ、微粉碎し、重さを計測する。約 0.1 グラム

を量り取って、有機溶媒（ブタノール/水）に抽出させる。分離および乾燥の後、残渣をメタノールに溶解し、NADを減少させる、胆汁酸との 3α -ヒドロキシステロイドステロイドデヒドロゲナーゼ反応を用いて、存在する胆汁酸の量を酵素的に測定する（Mashige, F.ら、Clin. Chem., 27, 1352 (1981)、参照として本明細書に組み入れられる）。

【0103】

ウサギ刷子縁膜小胞 (BBMV) における [3 H]-タウロコール酸の取り込み

マラティ (Malathi) ら (Biochimica Biophysica Acta, 554, 259 (1979)、参照として本明細書に組み入れられる) に記載されているカルシウム沈殿法によって、凍結された回腸粘膜からウサギ回腸の刷子縁膜を調製する。タウロコール酸塩を測定する方法は、アッセイ容量が $100\ \mu\text{l}$ ではなく $200\ \mu\text{l}$ になっているところを除けば、本質的には、クレイマー (Kramer) ら (Biochimica Biophysica Acta, 1111, 93 (1992) ; 参照として本明細書に組み入れられる) に記載されているとおりである。要約すると、室温で、 $2\ \mu\text{M}$ の [3 H]-タウロコール酸 ($0.75\ \mu\text{Ci}$)、 $20\ \text{mM}$ トリス、 $100\ \text{mM}$ NaCl、 $100\ \text{mM}$ マンニトール、pH 7.4を含む溶液 $190\ \mu\text{l}$ を、 $10\ \mu\text{l}$ の刷子縁膜小胞 ($60\sim 120\ \mu\text{g}$ タンパク質) とともに5秒間インキュベートする。インキュベーションは、ボルテックスをしながらBBMVを加えることによって開始し、氷冷した緩衝液 ($20\ \text{mM}$ Hepes-tris、 $150\ \text{mM}$ KCl) $5\ \text{ml}$ を加えることによって停止するが、停止後、ナイロンフィルター ($0.2\ \mu\text{m}$ 孔径) で直ちに濾過し、さらに、 $5\ \text{ml}$ の停止緩衝液でさらに洗浄する。

【0104】

アシル-CoA ; コレステロールアシルトランスフェラーゼ (ACAT)

ハムスターの肝臓およびラットの腸ミクロソームを、前記 (J. Biol. Chem., 255, 90098 (1980) ; 参照として本明細書に組み入れられる) のように、組織から調製し、ACAT酵素の供給源として用いる。アッセイ法では、 $50\ \text{mM}$ のリン酸ナトリウムと $2\ \text{mM}$ DTT pH 7.4の緩衝液で、 0.25% BSAおよび $200\ \mu\text{g}$ のミクロソームタンパク質を含む緩衝液の中に $24\ \mu\text{M}$ のオレオイル-CoA ($0.05\ \mu\text{Ci}$) を含む、 $2.0\ \text{ml}$ のインキュベーション液を使用する。本アッセイ法は、オレイルCoAを添加することによって開始する。反応は、 37°C で5分間行われ、 $8.0\ \text{ml}$ のクロロ

ホルム：メタノール (2:1) を添加することによって終結する。抽出液には、担体として作用させるために、クロロホルムメタノール中の125 μ gのコレステロールオレイン酸を加え、抽出液の有機相および水相を、完全にボルテックスした後、遠心して分離する。クロロホルム相を取り出して乾燥させてから、シリカゲル60 TLCプレートにスポットすると、ヘキサン/エチルエーテル (9:1) になる。発生するコレステロールエステルの量は、TLCプレート上のコレステロールオレイン酸スポットに取り込まれた放射エネルギーを、パッカーディンスタイメジャー (Packard Instamager) を用いて測定して決定することができる。

【0105】

脂肪低下剤を評価するためのイヌモデル

マーシャル牧場 (Marshall farm) などの販売業者から入手した、体重6~12 kgの雄のビーグル犬に一日一回、2時間餌を与え、水は自由に飲ませておく。イヌたちは、それぞれ6匹から12匹のイヌからなる、例えば、賦形剤、i.g.; 1 mg/kg, i.g.; 2 mg/kg, i.g.; 4 mg/kg, i.g.; 2 mg/kg, p.o. (カプセルに入った粉剤) などの投薬群に無作為に振り分ける。水溶液 (例えば、0.2% Tween 80溶液 [ポリオキシエチレンモノオレイン酸塩、ミズーリ州セントルイス、シグマケミカル会社 (Sigma Chemical Co.)]) に溶解した治療用物質の胃内への投薬は、胃管栄養チューブを用いて行うことができる。投薬を開始する前には、血清中のコレステロール (総コレステロールおよびHDL) およびトリグリセリドを評価するため、食餌を与える前の午前中に橈側皮静脈から血液試料を採取する。数日間継続して、午前中、食餌を与える前に動物に投薬を行う。動物には、残った食べ物を食べ終わるまで、2時間の食事時間を与える。実験の最後に、2日間にわたる糞便を採集し、胆汁酸含有量または脂肪含量について解析を行うことができる。実験前の血清中の脂肪レベルと比較するため、血液試料も治療期間の終わりに採取する。標準的なスチューデントT検定を、 $p < .05$ で用いて統計的有意性を判定する。

【0106】

イヌの血清中の脂肪測定

絶食させたイヌの橈側皮静脈から血液を採取して、血清分離チューブの中に入

れる (バキュテナー SST (Vacutainer SST; ニュージャージー州フランクリンレイク、ベクトンディキンソン社)。血液を2000 rpmで20分間遠心して、血清をデカントする。

【0107】

比色定量的に測定できる過酸化水素を生じさせるコレステロールオキシダーゼ反応を利用した和光の酵素診断キット (コレステロールCII) (和光純薬 (Wako Chemicals)、バージニア州リッチモンド)を用いて、96ウェルフォーマット上で総コレステロールを測定することができる。0.5 μ gから10 μ gのコレステロールから標準曲線をプレートの最初の2列で作成する。血清試料 (20~40 μ l、予想される脂肪濃度による)、または既知の血清対照試料を、反復して別々のウェルに加える。水を加えて、それぞれのウェルを100 μ lの容量にする。発色試薬の100 μ lのアリコートを各ウェルに加え、37℃で15分間インキュベートした後、500 nmでプレートを読む。

【0108】

HDLコレステロールは、LDLとVLDLを選択的に沈殿させるためにデキストラン硫酸とMgイオンとを利用する、シグマのキット番号: 352-3 (ミズーリ州セントルイス、シグマケミカル会社 (Sigma Chemical Co.))を用いてアッセイすることができる。各血清試料について150 μ l容量を、各遠心チューブに加えた後、15 μ lのHDLコレステロール試薬 (シグマ352-3) を添加する。試料を混合して、500 0 rpmで5分間遠心する。次に、50 μ lの上清アリコートを200 μ lの食塩水と混合して、総コレステロール量を測定する方法と同一の方法を用いてアッセイする。

【0109】

シグマのキット番号: 337を用いて、96ウェルフォーマット上でトリグリセリドを測定する。この方法では、トリグリセリドがリポタンパク質リパーゼと反応してグリセロールを遊離した後に、グリセロールを測定する。1 μ gから24 μ gの範囲のグリセロール標準溶液 (シグマ339-11) を用いて、標準曲線を作成する。血清試料 (20~40 μ l、予想される脂肪濃度による) を反復してウェルに加える。水を加えて、各ウェルの容量を100 μ lにし、100 μ lの発色試薬も各ウェル

に加える。混合し、15分間インキュベートした後、540 nmでプレートを読み、標準曲線からトリグリセリド値を計算する。複製したプレートも、酵素試薬をプランクに用いて実験を行い、血清試料中の内因性グリセロールについて補正する。

【0110】

イヌの糞便中の胆汁酸測定

糞便試料を採集して、各動物ごとに糞便中の胆汁酸(FBA)濃度を決定することができる。糞便の採集は、実験の最後の48時間の間、2つの連続する24時間の間、投薬および餌を食べる前に、毎日午前9時から10時の間に行うことができる。各動物からの2日分の採集物を別々にして、重さを計測し、プロセッサ（クウイジナート（Cuisinart））の中で滅菌水とともにまとめて破碎して、均一なスラリーを作製する。約1.4 gのホモジェネートを、最終濃度50%の第3級ブタノール/滅菌水（2:0.6）中、37℃の温水槽に入れ、45分間で抽出し、2000×gで13分間遠心分離する。胆汁酸の濃度（mmoles/日）は、96ウェル酵素アッセイシステム（1, 2）を用いて測定することができる。糞便抽出物の20 μ lアリコートをし、3回反復（triplicate）ウェルの2組に加える。標準化されたタウロコール酸ナトリウム溶液、および標準化された糞便抽出液（事前にプールされた試料から作製され、その胆汁酸濃度について特徴付けられている）も、アッセイの品質管理について分析することができる。標準曲線を作成するために連続希釈した、タウロコール酸ナトリウムの20ミリリットルアリコートも同様に、3回反復ウェルの2組に加える。1 Mヒトラジン水和物、0.1 Mピロリン酸、および0.46 mg/mlのNADを含む反応混合液230 μ lを各ウェルに加える。次に、50 μ lアリコートの3 α -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ酵素（HSD; 0.8ユニット/ml）またはアッセイ緩衝液（0.1 Mピロリン酸ナトリウム）を、3回反復ウェル2組のうちの一つに加える。試薬はすべて、ミズーリ州セントルイス、シグマケミカル社から入手することができる。室温で60分間インキュベートした後、340 nmにおける吸光度を測定し、3回反復試料の各セットの平均値を計算する。吸光度 \pm HSD酵素における差異を用い、タウロコール酸ナトリウムの標準曲線に基づいて、各試料の胆汁酸濃度（mM）を測定する。抽出物の胆汁酸濃度、糞便ホモジェネートの重量（グラム）、および動物の体重を用いて、各動物について対応するFBA濃度をmmoles/kg

/日として計算する。治療の結果としてFBA濃度が上昇した（デルタ値）ことを判定するために、賦形剤群のFBA平均濃度（mmoles/kg/日）を、各治療群のFBA濃度から差し引く。

【0111】

ヒト血漿におけるCETP活性アッセイ法（トリチウム化コレステリルエステル）

血液を健康なボランティアから採取する。血液は、EDTAを含むチューブの中に回収する（EDTA血漿プール）。EDTAヒト血漿プールは、予め-20℃に保存し、室温で融解してから、5分間遠心分離して、粒状の物質を取り除く。モートン（Morton）およびシルバースミット（Zilversmit）（J. Biol. Chem., 256,11992-95（1981））が記載するところにしたがって、コレステリルエステル部位を放射標識されたトリチウム化HDL（ $[^3\text{H}]\text{-CE-HDL}$ ）を、最終濃度（ $25\ \mu\text{g/ml}$ コレステロール）まで血漿に添加する。阻害化合物を以下のようにして添加する： $[^3\text{H}]\text{-CE-HDL}$ （ $396\ \mu\text{l}$ ）を含む等容量の血漿を、ピペットによって、マイクロチューブ（タイターチューブ（Titertube）（登録商標）、カリフォルニア州ハーキュリーズ、バイオラドラボラトリーズ（Bio-Rad laboratories）社製）の中に入れる。通常、20~50 mMの貯蔵溶液としてDMSOに溶解させてある化合物を、DMSO（または、場合によっては、ジメチルホルムアミドまたはエタノールなどの代わりの溶剤）で段階希釈する。次に、阻害剤化合物の段階希釈液またはDMSOのみをそれぞれ $4\ \mu\text{l}$ ずつ各血漿チューブに加える。チューブは速やかに混合する。各血漿チューブからの3つのアリコート（ $100\ \mu\text{l}$ ）を96ウェルの丸底ポリスチレンマイクロタイタープレート（コーニング（Corning）、ニューヨーク、コーニング（Corning）社製）のウェルに移す。プレートをプラスチックフィルムでシールし、37℃で4時間インキュベートする。試験用ウェルには、阻害化合物の希釈液を含む血漿が含まれている。対照ウェルには、DMSOのみを含む血漿が含まれている。ブランクウェルには、DMSOのみを含む血漿をマイクロチューブに入れて4℃で4時間インキュベートしておいたものを、インキュベートする時間が終わったところでマイクロタイターウェルに加える。すべてのウェルに $10\ \mu\text{l}$ の沈殿試薬（1%（w/v）デキストラン硫酸（デキストラリップ50（Dextralip 50）/0.5 M塩化マグネシウム、pH 7.4）を加えて、VLDLおよびLDLを沈殿させる。ウェルをプレートミキ

サー上で混合した後、室温で10分間インキュベートする。その後、10℃、1000×gで30分間プレートを遠心分離する。次に、各ウェルからの上清（50 μl）を、マイクロシント-40 (Microscint-40)（登録商標）（コネチカット州メリデン、パッカード (Packard) 社製）を250:1で含む、ピコプレート (Picolplate)（登録商標）（コネチカット州メリデン、パッカード (Packard) 社製）の96プレートウェルに移す。製造業者の指示に従って、プレートをヒートシールし (TopSeal 1-P (登録商標)、コネチカット州メリデン、パッカード (Packard) 社製)、30分間混合する。マイクロプレートシンチレーションカウンター (TopCount, コネチカット州メリデン、パッカード (Packard) 社製) 上で放射能を測定する。IC₅₀値は、[³H]-CE-HDL上清から、沈殿しているVLDLおよびLDLに、対照ウェルで得られた転移 (transfer) と比較して50%、[³H]-CEが転移することを阻害する阻害剤化合物の濃度として決定される。最大転移率% (対照ウェルにおける) は、以下の等式を用いて決定される。

$$\text{転移率\%} = \frac{[\text{dpm ブランク} - \text{dpm 対照}] \times 100}{\text{dpm ブランク}}$$

阻害剤化合物を含むウェルで測定される対照の転移率%は、以下のようにして決定される。

$$\text{対照\%} = \frac{[\text{dpm ブランク} - \text{dpm 試験}] \times 100}{\text{dpm ブランク} - \text{dpm 対照}}$$

IC₅₀値は、対照の割合 (%) と阻害剤化合物の濃度をプロットしたものから計算される。

【0112】

インビトロにおけるCETP活性

化合物のCETP活性を阻害する能力は、HDL供与粒子から、LDL受容体粒子への、放射性標識されたコレステリルエステル ([³H]-CE) の転移率を測定するインビトロアッセイ法を用いて評価される。このアッセイ法の詳細は、グレンら (Glenn) によって提供されている (GlennおよびMelton, 「コレステリルエステル転送タンパク質 (CETP) の定量 : A) CETP活性およびB) CETPタンパク質の免疫化学的アッセイ法 (Quantification of Cholesteryl Ester Transfer Protein)」, Met

h. Enzymol., 263, 339-351 (1996)). CETPは、CETPに対するcDNAで形質転換したCHO細胞の無血清馴化培地から得ることができる (Wang, S.ら, J. Biol. Chem. 267, 17487-17490 (1992))。CETP活性を測定するために、 $[^3\text{H}]$ -CE標識したHDL、LDL、CETP、およびアッセイ緩衝液 (50 mM トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン、pH 7.4; 150 mM 塩化ナトリウム; 2mM エチレンジアミン-テトラ酢酸; 1% ウシ血清アルブミン) を200 μl の容量で、96ウェルプレートの中、37℃にて2時間インキュベートする。LDLは、50 μl の1% (w/v) デキストラン硫酸/0.5 M 塩化マグネシウムを添加して、ボルテックスにより混和し、室温で10分間インキュベートすることによって差異を伴って沈殿する。この溶液 (200 μl) をフィルタープレート (ミリポア社 (Millipore) 製) に移す。濾過後、液体シンチレーションカウンターで、沈殿したLDLの中の放射能を測定する。CETPを含まない試料を入れることによって、非特異的転移または沈殿に関する補正を行う。このアッセイ法を用いた $[^3\text{H}]$ -CE転移率は、時間およびCETP濃度に関係しており、25~30%の転移 $[^3\text{H}]$ -CEまでは直線的である。

【0113】

さまざまな濃度の被験化合物存在下で上記のアッセイ法を行い、HDLからLDLへの $[^3\text{H}]$ -CEの転移を50%阻害するのに必要な濃度を決定することによって、被験化合物の効力を判定することができる。この値を IC_{50} と定義する。本アッセイ法によって決定される IC_{50} 値は、 IC_{50} が10 nMよりも大きい場合には正確であると考えられる。化合物の阻害能力が大きい場合には、インキュベーション時間を長くし (18時間まで)、また、CETPの最終濃度を低く (<50 nM) すれば、 IC_{50} の正確な測定値を決定することができる。

【0114】

インビボにおけるCETP活性の阻害

被験化合物によるCETP活性の阻害は、静脈注射または経口胃管栄養法によって化合物を動物に投与する段階、HDLからVLDLおよびLDL粒子にトリチウム標識されたコレステリルエステル ($[^3\text{H}]$ -CE) が転移する量を測定する段階、ならびにこの転移量を対照動物で観察された転移量と比較する段階によって判定することができる。

【0115】

雄のゴールデンシリアンハムスターを、0.24% コレステロールを含む固形飼料を食餌として、実験の少なくとも2週間前から維持する。静脈内投薬を受ける動物については、実験の直前に、ペントバルビタールで麻酔する。実験を通じて、麻酔状態を維持する。留置カテーテルを頸静脈と頸動脈に挿入する。実験の開始時に、 $[^3\text{H}]\text{-CE-HDL}$ を含む0.2 mlの溶液をすべての動物の頸静脈に投与する。 $[^3\text{H}]\text{-CE-HDL}$ は、トリチウム標識したコレステリルエステルを含むヒトHDLの調製物であり、グレンら (Glenn) (Meth. Enzymol., 263, 339-351 (1996))の方法に従って調製される。被験化合物は、80 mMの貯蔵溶液として、賦形剤 (2% エタノール、98% PEG 400, 米国ミズーリ州セントルイス、シグマケミカル社製) に溶解し、ボーラス注射によるか、連続的な注入によって投与する。 $[^3\text{H}]\text{-CE-HDL}$ 用量を投与してから2分後に、0.1 mlの被験化合物を動物の頸静脈に注射投与する。対照動物には、被験化合物を含まない賦形剤溶液0.1 mlを静脈内投与する。5分後、最初の血液試料 (0.5 ml) を、頸動脈から採取して、エチレンジアミン四酢酸を入れた標準的なマイクロテナー (microtainer) の中に回収する。食塩水 (0.5 ml) を注射して、カテーテルに流し、血液容量を入れ換える。その後、2時間後と4時間後に同一の方法で血液試料を採取する。血液試料は十分に混和した後、実験が完了するまで氷上にて維持する。血液試料を4℃で遠心分離して血漿を得る。この血漿 (50 μl) を、5 μl の沈殿試薬 (デキストラン硫酸、10 g/l; 0.5 M 塩化マグネシウム) で処理してVLDL/LDLを除去する。遠心分離した後、HDLを含む上清 (25 μl) が得られるので、液体シンチレーションカウンターを用いて、放射能についてこれを分析する。

【0116】

HLDからLDLおよびVLDLに転移した $[^3\text{H}]\text{-CE}$ の割合% (%転移) を、沈殿前の同等の血漿試料における全放射能を基にして計算する。一般的には、対照動物における、HLDからLDLおよびVLDLへの転移量は、4時間後に20%から35%になると思われる。

【0117】

または、意識のある、麻酔していない動物には、被験化合物を0.1% メチルセ

ルコース水溶液に懸濁して、経口胃管投与した用量を与えることができる。各化合物について決定された時間、すなわち、経口投与後、被験物質の血漿内レベルがピークに達した時期 (C_{max}) に、動物をペントバルビタールで麻酔した後、 $[^3H]$ -CE-HDLを含む0.2 mlの溶液を上記したように頸静脈に投与する。対照動物には、被験化合物を含まない賦形剤溶液0.25 mlを経口で胃管注入する。4時間後、動物を屠殺して、血液試料を採取して、上記したように、HDLからLDLおよびVLDLに転移した $[^3H]$ -CEの割合% (%転移) を測定する。

【0118】

または、被験化合物によるCETP活性の阻害は、遺伝子組換え操作によってヒトCETP (hCETP) を発現するものとして選択されたマウス (hCETPマウス) に化合物を投与することにより測定することができる。静脈注射または経口胃管注入によって被験化合物を投与し、HDLからVLDLおよびLDL粒子にトリチウム標識されたコレステリルエステル ($[^3H]$ -CE) が転移する量を測定し、対照動物で観察された転移量と比較することができる。hCETP遺伝子についてホモ接合のC57B1/6マウスを、ニシナ (Nishina) ら、(J. Lipid Res., 31, 859-869 (1990)) の記載にしたがって、TD88051などの高脂肪の固形飼料食餌で、実験前に少なくとも2週間飼育する。マウスに、被験化合物を0.1%メチルセルコース水溶液に懸濁したものを、経口胃管投与量を与えるか、10%エタノールおよび90%ポリエチレングリコール中に被験化合物を静脈内に投与することができる。対照動物には、被験化合物を含まない賦形剤溶液を経口胃管投与するか、または静脈内にボラス投与する。実験の開始時に、すべての動物の尾の静脈に、 $[^3H]$ -CE-HDLを含む0.05 mlの溶液を投与する。 $[^3H]$ -CE-HDLは、トリチウム標識したコレステリルエステルを含むヒトHDLの調製物であり、グレンら (Glenn) の方法 (Meth. Enzymol., 263, 339-351 (1996)) に従って調製する。30分後、動物の全血を採取し、血液は、エチレンジアミン四酢酸を入れた標準的なマイクロテナー (microtainer) の中に回収する。血液試料は十分に混和した後、実験が完了するまで氷上にて維持する。血液試料を4℃で遠心分離して血漿を得る。ゲル濾過クロマトグラフィーによって、この血漿を分離・分析し、VLDL、LDL、およびHDL領域における $[^3H]$ -CEの相対比を決定する。

【0119】

HLDからLDLおよびVLDLに転移した $[^3\text{H}]$ -CEの割合% (%転移)を、沈殿前の同等の血漿試料における全放射能を基にして計算する。一般的には、対照動物における、HLDからLDLおよびVLDLへの転移量は、30分後に、20%から35%になると思われる。

【0120】

腸コレステロール吸収アッセイ法

さまざまな化合物が、腸管からのコレステロールの吸収を阻害することが示されている。これらの化合物は、外因性の供給源（食物性コレステロール）および内因性コレステロール（胆嚢から腸管に分泌される）の双方に由来するコレステロールの腸による吸収も抑制することにより、血清中のコレステロール量を低下させる。

【0121】

ハムスターにおいては、腸によるコレステロールの吸収を測定するための二重同位体血漿比率法 (dual-isotope plasma ratio) の使用法が、ターレイ (Turley) による記載 (J. Lipid Res. 35, 329-339 (1994)) のように、改良され、評価されている。

【0122】

12時間間隔で明暗を繰り返す部屋の中で体重80~100 gの雄のハムスターに自由に食餌と水を与える。明期において4時間の時点で、各ハムスターに、イントラリピド (Intralipid) (20%)に懸濁した $2.5 \mu\text{Ci}$ の $[1,2-^3\text{H}]$ コレステロールの静脈内投与量を初回投与し、次に、中鎖トリグリセリド (medium chain triglycerids: MCT) の油中の $[4-^{14}\text{C}]$ コレステロールの経口投与量を投与する。静脈内投与 (i.v.) 用量は、0.4 ml容量のイントラリピド (Intralipid) 混合液を遠位の大腿静脈に注射することにより投与する。経口投与量は、0.6 ml容量のMCT油脂混合物を、ポリエチレン製チューブを通して、胃内に導入する胃管栄養法によって投与する。72時間後、ハムスターを放血させて、血漿内における ^3H および ^{14}C の量、および最初に投与された標識量を、液体シンチレーション分光測定法によって測定する。コレステロール吸収は、以下の等式に基づいて計算する。

吸収されたコレステロールの割合＝

$$\frac{\text{72時間血漿試料1 mlあたりの経口投与量の\%}}{\text{72時間血漿試料1 mlあたりの静脈内投与量の\%}} \times 100$$

【0123】

ミクロソームトリグリセリド輸送タンパク質 (MTP) アッセイ法：

MTPは、肝臓組織または培養細胞（例えば、HepG2細胞など）から、オーリンガー（Ohringer）らが記載する方法（Acta Crystallogr. D52, 224-225（1996）；参照として本明細書に組み入れられる）など、標準的な方法を用いて精製することができる。

【0124】

その後、MTP活性解析を、ジャミル（Jamil）らが記載するように（Proc. Natl. Acad. Sci. 93, 11991-11995（1996）；参照として本明細書に組み入れられる）にしたがって行うことができる。

【0125】

このアッセイ法の基本は、MTP存在下で、供与体となる小胞集団から受容体となる小胞集団への標識トリグリセリドの転移を測定するためのものである。MTPの阻害剤は、MTPを加える前に、MTPの阻害剤を混合液に加えることで評価することができる。供与体となる小胞は、卵のリン脂質、カルジオリピン、³H標識リン脂質、および¹⁴C標識トリグリセリドの水性混合液を超音波破碎することにより調製される。受容体となる小胞は、卵のリン脂質の水性混合液と超音波破碎することにより調製される。この小胞溶液は、MTP阻害剤を加えて混合するか、加えないままにしておいてから、MTPを加えて転移反応を開始させる。このアッセイ法では、60分後に0.5 mlのDE-52セルロースを加えて終了させ、その後、遠心分離して供与分子を沈殿させる。沈殿物中、および混合液中に最初に存在していた標識量中に存在する³Hと¹⁴Cの量を、液体シンチレーション分光測定法によって測定する。脂質輸送速度は、以下の式を用いる一次反応速度に基づいて計算される：

$$[S] = [S]_0 e^{-kt}$$

式中、 $[S]_0$ および $[S]$ は、それぞれ時間0と t における、供与体である膜ペレットに存在する ^{14}C 標識の画分であり、 k は、単位時間当たりに転移される標識画分である。

【0126】

ウサギにおける血漿脂質アッセイ法

血漿脂質は、参照として本明細書に組み入れられる、シュー (Schuh) ら、J. Clin. Invest., 91, 1453-1458 (1993)によって報告されているような方法を用いて測定することができる。ニュージーランドシロウサギの雄の群に、0.3% コレステロールおよび2% コーン油 (ザイグラブラザーズ社、ペンシルバニア州ガードナー (Gardner)) を添加した標準的な食餌 (100 g/日) を与える。水は自由に与える。対照群および処理動物群は、処理後1ヶ月後および3ヶ月後に屠殺する。アテローム性動脈硬化症の病変部の特徴を調べるために組織を除去する。血漿脂質濃度を測定するために血液試料を採取する。

【0127】

血漿脂質

脂質分析のための血漿は、耳の静脈からEDTAを含むチューブ (バキュテナー (Vacutainer) ; ニュージャージー州ラザフォード (Rutherford) 、ベクトン・ディキンソン社 (Becton Dickinson)) の中に血液を取り出した後、遠心分離して細胞を分離する。コレステロールオキシダーゼ反応 (C.A. Allainら、Clin. Chem., 20, 470-475 (1974) ; 参照として本明細書に組み入れられる) を用いて総コレステロール量を酵素的に測定した。HDLコレステロールも、マグネシウムを含むデキストラン硫酸によってLDLとVLDLを選択的に沈殿させた後、酵素的に測定した (G.R. Warnickら、Clin. Chem., 28, 1379-1388 (1982) ; 参照として本明細書に組み入れられる) 。血漿中のトリグリセリド量は、リポタンパク質リパーゼによって遊離されるグリセロール量を酵素結合アッセイ法 (G. Bucoloら、Clin. Chem., 19, 476-482 (1973) ; 参照として本明細書に組み入れられる) により測定することによって決定される。

【0128】

アテローム性動脈硬化症

動物をペントバルビタール注射により屠殺する。胸大動脈を速やかに切り取り、10%中性緩衝ホルマリンに浸漬して固定し、オイルレッドO (0.3%) にて染色する。動脈口の反対側の壁に沿って縦に切り込みを一つ入れた後、病斑領域を評価するために、血管を開いてピンで留める。解剖用顕微鏡に搭載されたカラー写真用カメラ (東芝3CCD) を接続しているカラー画像解析装置 (ビデオメトリック 150 (Videometric 150; カリフォルニア州サンディエゴ、アメリカンイノビジョン社 (American Innovision)) を用いる閾値解析によって、調べた領域全体に関する値および染色した領域に関する値から、病斑の被覆率%を決定する。組織中のコレステロールは、フォルク (Folch) ら、(J. Biol. Chem., 226, 497-509 (1957); 参照として本明細書に組み入れられる) の方法に従い、クロロホルム:メタノール (2:1) 混合物で抽出した後、既述したように酵素的に測定する。

【0129】

インビトロにおける血管応答

ペントバルビタールナトリウムを注射した後、腹大動脈を速やかに切り出して、酸素添加したクレブス重炭酸緩衝液の中に入れる。血管周囲の組織を取り除いた後、3 mmの環状セグメントを切り出して、クレブス重炭酸溶液を入れた37℃の筋肉用温水槽に入れ、1本がフォース・トランスデューサー (force transducer) (マサチューセッツ州クインシー (Quincy) 、グラスインスツルメント社 (Glass Instrument Co., MA)) に接触している2本のステンレス製ワイヤの間に吊す。温水槽にアンギオテンシンIIを加えると、それに応答して、力 (force) が変化し、それがチャート記録装置に記録される。

【0130】

本明細書における実施例は、前記実施例で用いた治療用化合物または不活性成分の代わりに、一般的または具体的に記述された治療用化合物または不活性成分を用いて実施することができる。

【0131】

以上、本発明を説明してきたが、同一発明が多様な方法において変化すること

があるのは明らかである。このような変化は、本発明の精神と範囲に逸脱するものとしては見なされるべきではなく、当業者に明らかな改変や同等なものはすべて特許請求の範囲内に含まれるものである。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K45/06 A61P9/00		Int. Appl. No. PCT/US 99/27945
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 94 09774 A (MERCK) 11 May 1994 (1994-05-11) claims 1,6 page 16, line 21-28	1,2,6, 10-12
A	WO 98 31367 A (BRISTOL-MYERS SQUIBB) 23 July 1998 (1998-07-23) claims 1,2,23,25 page 1, line 7-12 page 34, line 19-24 page 37, line 5-26	1-3,5-7, 10-12
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" documents published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Δ" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 17 May 2000		Date of mailing of the international search report 23/05/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5616 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Te. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Peeters, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. J. Appl. Application No

PCT/US 99/27945

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9409774 A	11-05-1994	US 5256689 A	26-10-1993
		AU 5538794 A	24-05-1994
WO 9831367 A	23-07-1998	AU 6131598 A	07-08-1998

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	識別記号	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P	3/06	A 6 1 P	3/06
	9/10		9/10
	43/00		43/00
	1 2 1		1 2 1

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

Fターム(参考) 4C084 AA02 AA18 MA02 NA05 ZA451
 ZA452 ZC331 ZC332
 4C086 AA02 BC17 MA02 MA04 MA09
 NA05 ZA45 ZC33
 4C206 AA02 DA28 DA30 DB25 DB43
 GA07 GA28 KA01 MA02 MA04
 MA12 NA05 ZA45 ZC33

THIS PAGE LEFT BLANK